



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



UNIVERSITÉ BADJİ MOKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DOMAINE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

THESE DE DOCTORAT

SPECIALITE : BIOCHIMIE APPLIQUEE

ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES ET EFFETS COMPARATIFS DE
Borago officinalis & *Urtica dioica* SUR L'INFLAMMATION BRONCHIQUE
DANS UN MODELE D'ASTHME EXPERIMENTAL CHEZ LES RATS DE LA
SUCHE WISTAR

Présentée par:

Hanène ZEMMOURI

JURY DE SOUTENANCE :

PRÉSIDENT : Pr Nouredine BOUZERNA (Annaba)

DIRECTEUR DE THESE : Dr Amel BOUMENDJEL (Annaba)

EXAMINATEUR : Pr Nassima BOUZEMI (Annaba)

EXAMINATEUR : Dr Abdallah OUELDJAOUI (Oum El Bouaghi)

INVITE: Pr Abdelfattah ELFEKI (Sfax, Tunisie)

INVITE: Pr Mohammed BOUAZIZ (Sfax, Tunisie)

Novembre 2015

Dédicace



A ma mère

A mon père

A mes frères Salaheddine et Tarek

Aux membres des familles Zemmouri et Harbi

A tous ceux à qui je tiens et j'aime, ils se reconnaîtront...

A la mémoire de notre chère Kaïd Laioun Fatma Zohra

Remerciements

Avant tout الحمد لله

Une thèse est la somme d'un travail collectif

Où l'apport de chacun,

Bien que d'importance inégale, est toujours indispensable et précieux

Ce mémoire ponctue le fruit de connaissances, expériences et réflexions échangées entre de nombreuses personnes en divers endroits et moments. J'espère que chacune s'y retrouvera un peu et que celles qui m'ont aidé à réaliser ce travail prendront autant de plaisir à le lire que j'en ai eue à le faire.

Je tiens alors à remercier les personnes suivantes :

Ma directrice de thèse, **Dr A. BOUMENDJEL** de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail, je vous remercie pour vos conseils pratiques, techniques et scientifiques tout au long de cette formation. Je voudrais également souligner vos qualités scientifiques et humaines, lesquelles m'ont permis après chaque entretien d'être inspirée et motivée afin de mettre ce travail en exécution le plus efficacement possible. Eternelle reconnaissance.

Le Professeur **N. BOUZERNA** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury et également pour les connaissances transmises durant mon cursus au niveau du département de Biochimie d'Annaba.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail : **Melle N. BOUZEMI** Professeur à l'université d'Annaba et **Mr A. OUELJAOUI** Docteur à l'université d'Oum El Bouaghi.

Je tiens particulièrement à remercier nos membres-invités :

- **Pr M. BOUAZIZ** pour son aide afin d'accomplir la partie chimique de ce travail, ses judicieux conseils mais aussi pour son chaleureux accueil à l'institut de biotechnologie et au laboratoire d'électrochimie et environnement au niveau de l'école des ingénieurs de Sfax (Tunisie) ainsi qu'à toute son équipe je ne peux dire que Merci.

- Au **Pr A. ELFEKI**, ce grand Monsieur de science, pour son chaleureux accueil au laboratoire d'écophysiologie animale à Sfax (Tunisie), pour ses qualités autant scientifiques que humaines, pour sa dévotion à la recherche scientifique qui m'ont épaté et motivé. Mes profonds remerciements.

A **Mr M. MESSARAH** Professeur à l'université d'Annaba et directeur du laboratoire de biochimie et de toxicologie environnemental pour ses conseils et son aide précieuse au cours de la partie pratique.

Je remercie aussi **Mr M. Boumendjel** d'avoir pris de son temps afin de mener à bien la finalisation de ce document de thèse, mes sincères remerciements.

Mes remerciements vont aussi à **Mr Z. Djeghaba** de m'avoir permis de travailler au niveau du laboratoire de chimie

Je remercie également **Mr A. LADJAMA** de m'avoir permis de travailler au sein du laboratoire de Biochimie et microbiologie appliquée.

Egalement mes remerciements vont à **Mme ZAIM Faiza** et **Mr TICHATI Lazher** pour leur aide précieuse, leur présence et leur écoute ainsi qu'aux membres du laboratoire 18 qui m'ont apporté aide et soutien sincères.

A l'ensemble du personnel administratif et étudiantin du département de biochimie qui ont contribué à ce travail. Merci.

A l'ensemble des doctorants de Sfax et particulièrement **Sonda**, pour sa sympathie, ses précieux conseils, sa disponibilité et son aide sans limite.

Je remercie également la **famille Affes**, grands et petits pour leur chaleureux accueil lors de mon séjour à Sfax (Tunisie).

Pour finir je remercie particulièrement :

Mon grand-père **HARBI Khelifa** pour son écoute, son soutien continu, son aide pour la récolte des plantes.

Mon frère **Tarek** et ma cousine **Leila** je ne vous remercierai jamais assez pour votre aide et présence dans un des moments les plus durs.

Ma cousine **Selma**, pour son continuel soutien moral.

A mes **tantes, oncles et cousins** pour leurs soutiens, ça y est j'y suis presque...

Ma double **Rym**, pour ses moments inoubliables aux laboratoires... pour sa présence, son soutien et son partage.

A ceux qui m'ont apporté leur aide de diverse façon je citerai : **Seifou, Kahina, Selwa et Monder**. A toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin et que j'ai peut être omises,

Merci.

Résumé

Le but de ce présent travail est d'étudier l'effet anti-asthmatique et antioxydant de deux extraits de plantes médicinales : *Borago officinalis* et *Urtica dioica* traditionnellement utilisés contre l'asthme et l'inflammation et ce dans le cadre d'un asthme induit expérimentalement.

Dans un premier temps, des rats mâles adultes de la souche Wistar ont été sensibilisés avec l'ovalbumine (OVA) et parallèlement traités à l'extrait le plus proche de l'utilisation traditionnelle c'est-à-dire par les extraits aqueux des deux plantes.

Afin de mesurer l'intensité de l'inflammation bronchique, les taux en cellules inflammatoires et en interleukine 4 (IL-4) dans le sérum et le liquide du lavage broncho-alvéolaire ont été mesurés, ainsi, qu'une étude histopathologique sur des coupes pulmonaires est effectuée. D'autre part, les paramètres du stress oxydant non-enzymatiques : glutathion réduit (GSH) et enzymatiques : glutathion peroxydase (GPx), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) sont analysés dans les poumons, le foie et les érythrocytes. Le taux de peroxydation lipidique est analysé en mesurant la concentration du malondialdéhyde (MDA) dans ces mêmes tissus.

La sensibilisation par l'OVA provoque une peroxydation lipidique intense aussi bien dans les poumons qu'au niveau du foie et des érythrocytes. Tout comme l'activité des systèmes antioxydants enzymatiques, GPx, SOD et CAT, et non enzymatique, GSH, ont été réduits. Toutefois, l'administration des extraits aqueux des deux plantes a réduit significativement le taux de MDA et a eu un effet bénéfique en rétablissant les taux des activités anti-oxydantes suscitées. Par ailleurs, il a été montré que l'extrait aqueux de bourrache est plus efficace que l'extrait d'ortie avec un meilleur effet additif en ce qui concerne les activités de la SOD, la GPx, et le GSH dans les poumons. Quoiqu'à l'inverse, l'extrait aqueux de l'ortie a été plus efficace dans la réduction de l'inflammation allergique, provoquée par l'OVA en réduisant significativement l'infiltration et le recrutement de cellules inflammatoires dans le tissu pulmonaire.

Par la suite, les extraits aqueux et des extraits éthanoliques des deux plantes ont été étudiés pour leur profil phénolique et leur capacité antioxydante *in vitro*. Il s'avère que le pouvoir antioxydant est corrélé à la teneur en composés phénoliques. Le rééquilibrage de la balance entre oxydant-antioxydant lors de l'administration des plantes, qui permet entre autre d'atténuer les symptômes de l'asthme est probablement attribué à la capacité antioxydante et anti-inflammatoire des composés contenus dans les extraits de bourrache et d'ortie.

Mots clés : asthme, *Borago officinalis*, *Urtica dioica*, ovalbumine, stress oxydatif, polyphénols.

الهدف من هذا العمل هو من جهة دراسة تأثير نبتتين طبيبتين محليتين : الححم المخزني *Borago officinalis* و القراص الكبير *Urtica dioica* ضد الربو التجريبي و الأوكسدة المترتبة عنه ومن جهة أخرى تحديد المركبات النباتية الفعالة في هاتين النبتتين. لذلك تم تحفيز فئران ذكور من سلالة Wistar عن طريق مستضد مادة الزلال (Ovalbumine) وتم علاجهم بواسطة مستخلصات من النبتتين.

لقياس شدة التهاب الشعب الهوائية، تم قياس تركيزات الخلايا الالتهابية و الانترلوكين 4 (IL-4) في مصلى الدم و في سائل غسل القصبات كما تم نسيجية مرضية في . ومن ناحية اخرى، تم قياس المعايير الأنزيمية للأوكسدة : بيروكسيد الجلوتاثيون (GPx)، سوبراكسيد ديسموتاز (SOD)، الكاتالاز (CAT) والغير الأنزيمية: الجلوتاثيون المرجع (GSH) وقد تمت هذه التحاليل في الرئتين والكبد وكريات الدم الحمراء. تم كذلك تحليل مستوى بيروكسيد الدهون عن طريق قياس تركيز (MDA) malondialdehyde في هذه الأنسجة.

نتائجنا تبين أن التحفيز المناعي بمادة الزلال يؤدي الى ارتفاع نسبة مؤشر الأوكسدة الليبيدية (MDA) في الأعضاء المدروسة. و تبين النتائج كذلك أن التحفيز المناعي يؤدي ايضا الى حالة من الاختلال في التوازن بين الانزيمات المضادة للأوكسدة و انتاج الجذور الحرة لفائدة هذه الأخيرة و نتيجة لذلك تتخفض بشكل دال احصائيا مستويات GSH، GPx، SOD و CAT. كما أنه عند استعمال المستخلصات النباتية يتبين انخفاض كبير في مستويات MDA و له تأثير مفيد من خلال استعادة معدل الأنشطة المضادة للأوكسدة (GSH، GPx، SOD و CAT). ففي الرئتين، يظهر مستخلص *Borago officinalis* انخفاض كبير في بيروكسيد الدهون وله تأثير أفضل على أنشطة SOD، GPx و GSH. أما مستخلص *Urtica dioica* كان أكثر فعالية في الحد من الالتهاب التحسسي بعد التحفيز المناعي بمادة الزلال OVA و هذا بتخفيض ملحوظ في نسبة التسلسل وتجنيد الخلايا الالتهابية في النسيج الرئوي.

من ناحية اخرى، تم دراسة المحتوى الفينولي والقدرة المضادة للأوكسدة *in vitro* للمستخلصات النباتية. ويبدو أن القدرة على أن يكون المستخلص مضاد للأوكسدة *in vivo* ترتبط بمحتواه الفينولي. مما سبق يمكننا أن نستخلص أن انخفاض مستوى الإجهاد التأكسدي وبالتالي التخفيف من حدة أعراض الربو يرجعوا إلى تواجد المركبات الفينولية في المستخلصات النباتية لححم المخزنية و القراص الكبير و قدرتها المضادة للأوكسدة والالتهاب.

: الربو، الححم المخزنية، القراص الكبير، الاجهاد التأكسدي، مادة الزلال، البوليفينول.

Abstract

The aim of the present work is to study the anti-asthmatic and anti-oxidant effects of two medicinal plant traditionally used against asthma and inflammation: *Borago officinalis* and *Urtica dioica*.

First, the Wistar adult male rats were sensitized with ovalbumin (OVA) and treated with extract closest to the traditional use ie the aqueous extracts of the two plants.

To measure the intensity of the airway inflammation, the concentrations of inflammatory cells and interleukin-4 (IL-4) in serum and bronchoalveolar lavage were measured, and a histopathology study on lung sections is performed. On the other hand, no-enzymatic oxidative stress parameters: reduced glutathione (GSH) and enzymatic: Glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) were analyzed in the lungs, liver, and erythrocytes. The lipid peroxidation level is analyzed by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) in these same tissues.

The OVA sensitization causes intense lipid peroxidation in lungs, liver and erythrocytes. Also, the activity of antioxidant enzyme systems, GPx, SOD and CAT and non-enzymatic, GSH, were reduced. However, the administration of aqueous extracts of the two plants significantly reduced MDA levels and has had a beneficial effect by restoring the rate of antioxidant activities. Furthermore, it has been shown that the borage aqueous extract is more effective than the extract of nettle with a better additive effect as regards the activity of SOD, GPx and GSH in the lungs. Conversely, the aqueous extract of nettle was more effective in reducing allergic inflammation, caused by OVA, by significantly reducing infiltration and recruitment of inflammatory cells in the lung tissue.

Then, the aqueous extracts and ethanol extracts of both plants were studied for their phenolic profile and antioxidant capacity *in vitro*. It appears that the antioxidant power is correlated with the phenolic content. The rebalances of the balance between oxidant-antioxidant during administration of the plants, thus alleviating the symptoms of asthma is probably due to the antioxidant and anti-inflammatory capacity of compounds contained in extracts of borage and nettles.

Key words: asthma, *Borago officinalis*, *Urtica dioica*, ovalbumin, oxidative stress, polyphenols.

Sommaire

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE I. L'ASTHME	3
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE II. LE STRESS	12
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE III. LES POLYPHENOLS	23
PARTIE EXPERIMENTALE : MATERIEL ET METHODES	31
PARTIE EXPERIMENTALE : RESULTATS & DISCUSSION	61
CONCLUSION	148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150
ANNEXES	166

Table des matières

RESUME	I
.....	II
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABREVIATIONS	XIII
INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE I. L'ASTHME	3
1.1. EPIDEMIOLOGIE	3
1.2. FACTEURS ETIOLOGIQUES DE L'ASTHME	3
1.2.1. <i>Facteurs prédisposants</i>	3
1.2.2. <i>Les facteurs déclenchants</i>	4
1.3. SENSIBILISATION ALLERGENIQUE.....	5
1.4. INFLAMMATION ET REMODELAGE BRONCHIQUE.....	7
1.5. MARQUEURS DE L'INFLAMMATION BRONCHIQUE	9
1.5.1 <i>Médiateurs de la réponse immunitaire</i>	9
1.5.2. <i>Marqueurs du stress oxydant</i>	10
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE II. LE STRESS	12
1. LES RADICAUX LIBRES.....	12
1.1. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.....	12
<i>Les espèces oxygénées réactives radicalaires</i>	12
a. Le radical superoxyde, $O_2^{\bullet -}$	12
b. Le radical hydroxyle, HO^{\bullet}	13
c. Les radicaux peroxyles	13
d. Le radical secondaire alkoxyles RO^{\bullet}	13
<i>Les espèces oxygénées non radicalaires</i>	13
a. L'oxygène singulet 1O_2 ,	13
b. Le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2	13
c. L'acide hypochloreux, $HOCl$	14
1.2. LES ESPECES REACTIVES DE L'AZOTE.....	14
a. Le monoxyde d'azote, $\bullet NO$	14
b. Le peroxydinitrite, $ONOO^-$	15
2. LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES.....	15
2.1. LA PRODUCTION INTRACELLULAIRE.....	15
2.2. LA PRODUCTION EXTRACELLULAIRE	16
3. MECANISMES D'ACTION DES ESPECES REACTIVES OXYGENEES ET LE STRESS OXYDANT OU OXYDATIF	16
a. Oxydation des composés lipidiques	17

b. Oxydation des composés protéiques	18
c. Oxydation de l'ADN	19
4. PROTECTIONS CELLULAIRES	19
4.1. LES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES	20
a. Les superoxyde dismutases (SOD)	20
b. La catalase (CAT)	20
c. Les glutathion peroxydases (GPx)	21
4.2. LES ANTIOXYDANTS NON-ENZYMATIQUES.....	21
a. Systèmes antioxydants endogènes	21
b. Systèmes antioxydants exogènes	22
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE III. LES POLYPHENOLS	23
1. CLASSIFICATION CHIMIQUE	23
1.1. LES ACIDES PHENOLIQUES	24
1.1.1. <i>Acides hydroxybenzoïques</i>	24
1.1.2. <i>Acides hydroxycinnamiques</i>	24
1.2. LES FLAVONOÏDES	24
1.2.1. <i>Les 4-oxoflavonoïdes</i>	25
1.2.2. <i>Les chalcones</i>	26
1.2.3. <i>Les flavanols</i>	26
1.2.4. <i>Les anthocyanes</i>	26
1.3. TANINS	26
2. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET INTERETS THERAPEUTIQUES	26
2.1. PROPRIETE ANTIOXYDANTE DES POLYPHENOLS	26
<i>Capture ou piégeage directe des ERO</i>	27
<i>Chélation des ions métalliques</i>	28
<i>Inhibition des enzymes</i>	28
<i>Inhibition de la peroxydation lipidique</i>	29
Activité antioxydante des acides phénoliques.....	29
2.2. POLYPHENOLS ET INFLAMMATION	30
2.3. POLYPHENOLS ET ACTIVITE ANTI-ASTHMATIQUE.....	30
PARTIE EXPERIMENTALE : MATERIEL ET METHODES	31
BUT ET OBJECTIFS.....	31
1. ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE & DES PROPRIETES ANTI-OXYDANTES DES PLANTES CHOISIES.....	33
1.1. MONOGRAPHIES DES DEUX PLANTES ETUDIEES.....	33
1.1.1. <i>La bourrache Borago officinalis L.</i>	33
1.1.2. <i>L'ortie Urtica dioica L.</i>	34
1.2. CUEILLETTE DU MATERIEL VEGETAL	36
1.3. EXTRACTIONS	37
a. <i>Extraction à l'eau</i>	37
b. <i>Extraction hydro-alcoolique</i>	37
c. <i>Calculs des rendements d'extraction:</i>	37
1.4. DOSAGES COLORIMETRIQUES DES COMPOSES PHENOLIQUES	38
1.4.1. <i>Dosage des phénols totaux</i>	38
Protocole expérimental	38
1.4.2. <i>Dosage des ortho-diphénols</i>	39
Protocole expérimental	39

1.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	40
Protocole expérimental	40
1.4.4. Dosage des flavanols	41
Protocole expérimental	41
1.4.5. Dosage des tanins.....	42
Protocole expérimental	42
1.4.6. Dosage des anthocyanes	43
1.5. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE <i>IN VITRO</i>	44
1.5.1. Etude de l'activité antioxydante : Méthode DPPH.....	44
Protocole expérimental	44
Détermination de l'IC ₅₀	45
1.5.2. Etude de l'activité antioxydante par la méthode NBT.....	45
Protocole expérimental	45
1.5.3. Etude de l'activité antioxydante totale.....	46
Protocole expérimental	46
1.6. SEPARATION ET PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS)	46
Protocole expérimental	47
2. ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES <i>IN VIVO</i>.....	48
2.1. ANIMAUX ET CONDITIONS D'ELEVAGE.....	48
2.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	48
2.2.1. Formation des lots et traitements des rats.....	48
2.2.2. Sensibilisation à l'ovalbumine	49
2.2.3. Provocation des animaux par aérosol	49
2.3. SACRIFICE ET PRELEVEMENTS	50
2.3.1. Prélèvement sanguin	50
2.3.2. Prélèvement du liquide broncho-alvéolaire.....	50
2.3.3. Prélèvement des organes	51
2.4. DOSAGE DES PROTEINES	51
2.5. NUMERATION DES LEUCOCYTES AU NIVEAU DU LIQUIDE DU LBA.....	51
2.6. DOSAGE ELISA DE L'INTERLEUKINE-4	52
Protocole expérimental	53
2.7. ETUDE HISTOLOGIQUE.....	53
a. Fixation.....	53
b. Enrobage et obtention des blocs	53
c. Confection de coupes.....	54
d. Coloration	54
2.8. EXPLORATION DES PARAMETRES DU STRESS OXYDANT.....	54
2.8.1. Dosage du malondialdéhyde	54
2.8.2. Dosage du glutathion	55
2.8.3. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) :	56
Protocole expérimental	57
2.8.4. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) :	57
Protocole expérimental	57
Calcul de l'activité SOD	58
2.8.5. Dosage de l'activité catalase (CAT)	58
Protocole expérimental	59
3. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS	60
PARTIE EXPERIMENTALE : RESULTATS & DISCUSSION	61

1. LA COMPOSITION CHIMIQUE & LES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DES PLANTES CHOISIES	61
1.1. RESULTATS DES EXTRACTIONS	61
1.2. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES	61
1.2.1. Dosage des phénols totaux.....	62
1.2.2. Dosage des ortho-diphénols	62
1.2.3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	63
1.2.4. Dosage des flavanols totaux.....	63
1.2.5. Dosage des tanins totaux	64
1.2.6. Dosage des anthocyanes	64
1.3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE	66
1.3.1. Méthode DPPH	66
1.3.2. Méthode NBT.....	67
1.3.3. Activité antioxydante totale	68
1.4. ETUDE DES CORRELATIONS.....	68
1.5. RESULTATS DE L'ANALYSE PAR LC MS/MS	74
1.5.1. Résultats de l'analyse par LC MS/MS pour les extraits de <i>Borago officinalis</i>	74
1.5.2. Résultats de l'analyse par LC MS/MS pour l'extrait éthanolique d' <i>Urtica dioica</i>	98
DEMARCHE D'IDENTIFICATION DES COMPOSES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE D'URTICA DIOICA.....	100
DISCUSSION.....	106
2. LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES DEUX PLANTES.....	110
VARIATIONS DES PARAMETRES PHYSIO-HEMATOLOGIQUES & HISTOLOGIQUES	110
2.1. ETUDE DU POIDS CORPOREL ET DU POIDS RELATIF DES ORGANES	110
2.1.1. La croissance corporelle.....	110
2.1.2. Effet sur le poids relatif du foie et des poumons	117
2.2. ETUDE DES PARAMETRES DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE	118
2.2.1. Taux des leucocytes dans le sang	118
2.2.2. Numération des leucocytes dans le liquide du LBA.....	118
2.3. DOSAGE DE L'INTERLEUKINE-4.....	121
2.4. ETUDE HISTOLOGIQUE.....	122
VARIATIONS DES PARAMETRES DU STRESS OXYDANT	129
2.5. LA PEROXYDATION LIPIDIQUE (DOSAGE DU MALONDIALDEHYDE)	129
2.6. LE GLUTATHION REDUIT.....	129
2.7. LA GLUTATHION PEROXYDASE	132
2.8. LA SUPEROXYDE DISMUTASE.....	132
2.9. LA CATALASE	135
2.10. ETUDE DE LA CORRELATION ENTRE LES PARAMETRES ETUDIES:.....	137
<i>Corrélations entre les paramètres in vivo</i>	137
<i>Corrélations entre les paramètres in vivo versus in vitro</i>	138
CONCLUSION.....	148
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	150
ANNEXES.....	166

Liste des figures

FIGURE 1. LES DIFFERENTS TYPES DE FACTEURS DECLENCHANT PRESENTS DANS L'ENVIRONNEMENT	5
FIGURE 2. LA PATHOGENESE DE L'ASTHME BRONCHIQUE (MODIFIE D'APRES GIRODET ET TUNON DE LARA, 2007).....	7
FIGURE 3. REPRESENTATION D'UNE BRONCHE SAIN (A) ET D'UNE BRONCHE D'UN SUJET ASTHMATIQUE (B).....	8
FIGURE 4. ROLE DES RADICAUX LIBRES OXYGENES ET DES ESPECES REACTIVES DE L'AZOTE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME	11
FIGURE 5. SITES DE PRODUCTION INTRACELLULAIRE DES ERO	16
FIGURE 6. LES CONSEQUENCES MOLECULAIRES DU STRESS OXYDANT	17
FIGURE 7. STRUCTURE CHIMIQUE DU MDA	18
FIGURE 8. REACTIONS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.....	18
FIGURE 9. SCHEMATISATION DES MOLECULES INTERVENANT DANS LES PROTECTIONS CELLULAIRES.....	19
FIGURE 10. STRUCTURE DES ACIDES HYDROXYBENZOÏQUES.....	24
FIGURE 11. STRUCTURE DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES	24
FIGURE 12. LES DIFFERENTS TYPES DE FLAVONOÏDES A PARTIR DU SQUELETTE FLAVANE	25
FIGURE 13. RELATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE AVEC LA STRUCTURE DES FLAVONOÏDES	27
FIGURE 14. PIEGEAGE DES ROS (R.) PAR LES FLAVONOÏDES (FI-OH) POUR FORMER UN RADICAL FLAVONOÏDE PHENOXYL (FI-O.), QUI A SON TOUR REAGIT AVEC UN AUTRE ROS POUR DONNER UNE STRUCTURE QUINONE STABLE.....	28
FIGURE 15. LES SITES DU FLAVONOÏDE PROPOSES POUR LA CHELATION DES IONS METALLIQUES (Mn+): (A) UN NOYAU CATECHOL SUR LE CYCLE B, (B) LES GROUPES 3-HYDROXYLE ET 4-OXO DU CYCLE C, ET (C) LES GROUPES 4-OXO ET 5-HYDROXYLE ENTRE LES CYCLES A ET C.....	28
FIGURE 16. PROCESSUS ENZYMATIQUE CATALYSE PAR LA XANTHINE OXYDASE	29
FIGURE 17. SCHEMA RECAPITULATIF DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL	32
FIGURE 18. <i>BORAGO OFFICINALIS</i> , BOURRACHE, BORAGE, DE LA FAMILLE DES BORRAGINACEES	34
FIGURE 19. L'ORTIE, <i>URTICA DIOICA</i> , NETTLE, DE LA FAMILLE DES URTICACEES	35
FIGURE 20. LIEUX DE RECOLTES DES DEUX PLANTES.....	36
FIGURE 21. SCHEMA GENERAL D'EXTRACTION.....	37
FIGURE 22. COURBE DE VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE (DO) A $\lambda=727$ NM EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'ACIDE GALLIQUE (AG).....	38
FIGURE 23. COURBE DE VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE (DO) A $\lambda=370$ NM EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'ACIDE CAFEIQUE (AC)	39
FIGURE 24. COURBE DE VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE (DO) A $\lambda=510$ NM EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE LA QUERCETINE (QE)	40
FIGURE 25. COURBE D'ETALONNAGE DE LA RUTINE (R) POUR LE DOSAGE DES FLAVANOLS TOTAUX	41
FIGURE 26. COURBE D'ETALONNAGE DE LA CATECHINE (CA) POUR LE DOSAGE DES TANINS.....	42
FIGURE 27. REACTION DE PIEGEAGE DU RADICAL DPPH PAR LE PHENOL	44
FIGURE 28. SCHEMA DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA MS/MS	47
FIGURE 29. COMPARTIMENTATION DES RATS EN SIX LOTS TRAITES DIFFEREMMENT	49
FIGURE 30. PROTOCOLE DE SENSIBILISATION	49
FIGURE 31. SCHEMA MONTRANT LA PROVOCATION DES RATS PAR L'AEROSOL	50
FIGURE 32. LA GAMME D'ETALONNAGE DU BSA (MG/ML)	51
FIGURE 33. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ELISA SANDWICH	52
FIGURE 34. REACTION DU DIALDEHYDE MALONIQUE AVEC L'ACIDE THIOBARBITURIQUE.....	55
FIGURE 35. VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DE POLYPHENOLS TOTAUX DANS LES EXTRAITS DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i> (BO) ET <i>URTICA DIOICA</i> (UD)	62
FIGURE 36. VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DES ORTHO-PHENOLS TOTAUX DANS LES EXTRAITS DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i> (BO) ET <i>URTICA DIOICA</i> (UD)	63

FIGURE 37. VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DE FLAVONOÏDES TOTAUX DANS LES EXTRAITS DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i> (BO) ET <i>URTICA DIOICA</i> (UD)	63
FIGURE 38. VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DE FLAVANOLS TOTAUX DANS LES EXTRAITS DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i> (BO) ET <i>URTICA DIOICA</i> (UD)	64
FIGURE 39. VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DE TANINS TOTAUX DANS LES EXTRAITS DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i> (BO) ET <i>URTICA DIOICA</i> (UD)	64
FIGURE 40. VARIATIONS DES CONCENTRATIONS D'ANTHOCYANES TOTAUX DANS LES EXTRAITS DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i> (BO) ET <i>URTICA DIOICA</i> (UD)	65
FIGURE 41. CORRELATION ENTRE LA QUANTITE EN PHENOLS DES EXTRAITS ET LE TEST DPPH (A), LE TEST NBT (B) ET L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE TOTALE (C)	69
FIGURE 42. PROFILS DES CHROMATOGRAMMES DANS LES MODES POSITIF ET NEGATIF DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i> OBTENUS PAR LC MS/MS	76
FIGURE 43. PROFILS DES CHROMATOGRAMMES DANS LES MODES POSITIF ET NEGATIF DE L'EXTRAIT D'ETHANOL DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i> OBTENUS PAR LC MS/MS.....	77
FIGURE 44. STRUCTURE CHIMIQUE DU M-GERANYL-P HYDROXYBENZOIQUE.....	79
FIGURE 45. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 3 A M/z 181	80
FIGURE 46. SPECTRE DE MASSE [M-H]- DU COMPOSE 4 A M/z 181	80
FIGURE 47. SPECTRE DE MASSE [M + H]+ DU COMPOSE 8 A M/z 197.....	81
FIGURE 48. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 13 A M/z 539	82
FIGURE 49. SCHEMA PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 13 (M/z 539)	82
FIGURE 50. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ DU COMPOSE 16 A M/z 207	83
FIGURE 51. STRUCTURE CHIMIQUE DE LA LUTEOLINE 7,3',4'-TRIMETHYLE ETHER (A) ET DU KAEMPFEROL 3,7,4'- TRIMETHYLE ETHER (B).....	83
FIGURE 52. SPECTRE DE MASSE [M-H]- DU COMPOSE 20 A M/z 291	84
FIGURE 53. SPECTRE DE MASSE [M-H]- DU COMPOSE 21 A M/z 433	84
FIGURE 54. SPECTRE DE MASSE [M+H]+ DU COMPOSE 22 A M/z 301	85
FIGURE 55. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 2 A M/z 335.....	86
FIGURE 56. SPECTRE DE MASSE [M+H]+ EN MS ¹ ET MS ² DE COMPOSE 5 A M/z 387	87
FIGURE 57. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 6 A M/z 717	87
FIGURE 58. SPECTRE DE MASSE [M+H]+ EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 7 A M/z 465.....	88
FIGURE 59. SCHEMA PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 7 A M/z 465	88
FIGURE 60. STRUCTURE CHIMIQUE DU B-SITOSTEROL.....	89
FIGURE 61. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 10 A M/z 447	89
FIGURE 62. MECANISME PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 10 (M/z 447)	90
FIGURE 63. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 11 A M/z 447	91
FIGURE 64. MECANISME PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 11 (M/z 447)	92
FIGURE 65. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 12 A M/z 451	93
FIGURE 66. MECANISME PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 12 (M/z 451)	93
FIGURE 67. SPECTRE DE MASSE [M-H]- EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 14 M/z 431.....	94
FIGURE 68. MECANISME PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 14 (M/z 431)	95
FIGURE 69. STRUCTURES DES DIFFERENTES FORMES D'ISOMERES DE L'APIGENINE GLUCOSIDE	96
FIGURE 70. SPECTRE DE MASSE [M+H]+ DU COMPOSE 17 A M/z 181	97
FIGURE 71. SCHEMA PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 17 (M/z 181)	97
FIGURE 72. PROFILS DES CHROMATOGRAMMES DANS LES MODES POSITIF ET NEGATIF DE L'EXTRAIT D'ETHANOL D' <i>URTICA DIOICA</i> OBTENUS PAR LC MS/MS.	98
FIGURE 73. SPECTRE DE MASSE MS ² [M-H]- DU COMPOSE 1 A M/z 161.....	100
FIGURE 74. SPECTRE DE MASSE [M-H]- DU COMPOSE 2 A M/z 315	101
FIGURE 75. MECANISME PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 2 A M/z 315.....	101
FIGURE 76. SPECTRE DE MASSE EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 3 M/z 531	102
FIGURE 77. SPECTRE DE MASSE EN MS ¹ ET MS ² DU COMPOSE 5 A M/z 449.....	102

FIGURE 78. MECANISME PROPOSE POUR LA FRAGMENTATION DU COMPOSE 5 A M/z 449	103
FIGURE 79. STRUCTURE DE LA BAICALINE	104
FIGURE 80. SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE 8 A M/z 327	104
FIGURE 81. SPECTRE DE MASSE MS ² DU COMPOSE 9 A M/z 227	105

Liste des tableaux

TABLEAU I. PRINCIPALES CLASSES DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	23
TABLEAU II. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU TEST ELISA	53
TABLEAU III. COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL POUR LE DOSAGE DE LA SOD.....	58
TABLEAU IV. COMPOSITION DU MILIEU REACTIONNEL POUR LE DOSAGE DE LA CAT.....	59
TABLEAU V. RENDEMENTS DES EXTRACTIONS DIFFERENTIELLES OBTENUES POUR LES DEUX PLANTES.....	61
TABLEAU VI. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS DE PLANTES, MESUREES PAR LA METHODE DPPH ET EXPRIMEES EN IC ₅₀	66
TABLEAU VII. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES EXTRAITS DE PLANTES MESUREES PAR LA METHODE NBT	67
TABLEAU VIII. ACTIVITE ANTIOXYDANTE TOTALE DES QUATRE EXTRAITS DE PLANTES	68
TABLEAU IX. L'ENSEMBLE DES COMPOSES IDENTIFIES DANS LES EXTRAITS DE BOURACHE ET D'ORTIE.....	75
TABLEAU X. COMPOSES IDENTIFIES PAR LC MS/MS DANS LES EXTRAITS DE <i>BORAGO OFFICINALIS</i>	78
TABLEAU XI. COMPOSES IDENTIFIES PAR LC MS/MS DANS L'EXTRAIT D'ETHANOL D' <i>URTICA DIOICA</i>	99
TABLEAU XII. VARIATIONS DU POIDS CORPOREL PC (G) ET DU POIDS RELATIF PR (G/100G DE POIDS CORPOREL) DES ORGANES (FOIE ET POUMONS)	116
TABLEAU XIII. VARIATION DES TAUX DE GLOBULES BLANCS (GB) ET DE LYMPHOCYTES (LC) DANS LE SANG	119
TABLEAU XIV. NUMERATION DES EOSINOPHILES ET DES LYMPHOCYTES DANS LE LIQUIDE DU LBA	120
TABLEAU XV. CORRELATIONS ENTRE LES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION BRONCHIQUE ET CEUX DU STRESS OXYDATIF	139
TABLEAU XVI. CORRELATIONS ENTRE LES TENEURS EN COMPOSES PHENOLIQUES, L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET LES PARAMETRES DE L'INFLAMMATION BRONCHIQUE ET CEUX DU STRESS OXYDATIF	140

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
BHT:	Butylated <i>hydroxytoluene</i> (Hydroxytoluène butylé).
BO :	<i>Borago officinalis</i> .
BSA :	Serum albumin bovin (Albumine de sérum bovin)
CAT :	Catalase.
Cu :	Cuivre.
DNTB :	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.
DL₅₀:	Dose létale médiane.
DO:	Densité optique.
DPPH:	2,2 Diphényl-1-picrylhydrazyl.
EDTA :	Ethylène diamine tétra-acétique.
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)
ERO (ou ROS) :	Espèces Réactives de l'Oxygène (Reactive Oxygen Species).
ERN:	Espèces réactives de l'azote.
Fe:	Fer.
Fl:	Flavonoïdes.
GM-CSF:	Granulocyte-macrophage colonie-stimulating factor.
GPx :	Glutathion peroxydase.
GSH :	Glutathion réduit.
IC₅₀:	Concentration d'inhibition à 50%.
Ig :	Immunoglobulines.
INF :	Interféron.
IL :	Interleukine.
LBA :	Lavage broncho-alvéolaire.
LC MS :	Chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse.
MDA :	Malondialdéhyde.
Mn:	Manganèse.
m/z :	Masse/Charge.
NO:	Oxyde d'azote.
NOS :	Nitric oxide synthase (synthase d'oxyde nitrique)
OMS :	Organisation mondiale de la santé.
OVA:	Ovalbumine.
PAF:	<i>Platelet Activating Factor</i> (facteur d'activation plaquettaire).
PC:	Poids corporel.
PR:	Poids relatif.
R:	Radical.
SOD:	Superoxyde Dismutase.
TBA:	Acide thiobarbiturique.
Th:	T <i>helper</i> (lymphocyte T auxiliaire)
TNF:	<i>Tumour Necrosis Factor</i> (facteur de nécrose tumoral)
UD :	<i>Urtica dioica</i> .
Uma :	Unité de masse atomique.
UV:	Ultra-violet.

Introduction

L'asthme est une maladie inflammatoire complexe qui constitue un important problème de santé publique. En effet, il s'agit de l'une des pathologies chroniques les plus fréquentes, avec plus de 300 millions de personnes atteintes dans le monde et enregistrant plus de 250000 morts par an (The Global Asthma Report, 2014; Pearce et *al.*, 2007). En Algérie, où l'urbanisation continue et l'occidentalisation du mode de vie contribueraient à l'augmentation de la prévalence de cette maladie, on enregistre un million et demi de personnes asthmatiques avec 1000 décès par an (Enquête Nationale Santé -TAHINA-, 2007).

Au cours de la pathologie asthmatique, l'exposition allergénique figure en tête parmi les facteurs environnementaux les plus importants dans la genèse et l'expression de la maladie (Louis et *al.*, 2012). En effet, lorsqu'un allergène pénètre par la surface des muqueuses des bronches, il est pris en charge par le système immunitaire qui produit des anticorps de type IgE. Ces derniers sensibilisent les mastocytes de façon à ce que lors d'une exposition ultérieure au même allergène, ce dernier est immédiatement reconnu par ces IgE et il s'en suit une libération en cascade de médiateurs préformés. Ces substances provoquent une broncho-constriction, la sécrétion de mucus et le rétrécissement du diamètre de la bronchiole entravant ainsi la respiration chez les individus asthmatiques (Wu et *al.*, 2014). Au cours de la genèse de l'asthme, il a été prouvé qu'un déséquilibre prononcé entre les éléments antioxydants et oxydants en faveur de ces derniers contribueraient à aggraver la physiopathologie de l'asthme par le stress oxydant (Koshy et *al.*, 2014).

Durant plusieurs décennies, le traitement de l'asthme a été considérablement amélioré, surtout grâce à la disponibilité de plusieurs classes de médicaments ayant des mécanismes d'action différents (Chu et Drazen, 2005). Parmi lesquels ceux à base de plantes médicinales douées de propriétés antioxydantes. C'est ainsi que la phytothérapie s'est développée dans les pays industrialisés, où c'est sous forme de thérapies complémentaires que les plantes sont aujourd'hui surtout utilisées. En Europe et en Amérique du Nord, plus de 50% de la population a eu recours au moins une fois à des compléments alimentaires à base de plantes (Chaabi, 2008).

En Afrique, d'autres raisons ont fait que la phytothérapie se développe : le manque de ressources économiques ainsi que l'accroissement des difficultés d'accès aux soins primaires.

C'est alors que beaucoup de patients asthmatiques se sont tournés vers les traitements traditionnels à base de plantes médicinales locales.

Quand elle n'est pas un choix, la phytothérapie est donc une nécessité.

Notre objectif a été donc d'essayer de valider scientifiquement les usages traditionnels antiasthmatiques de deux plantes endémiques : la bourache *Borago officinalis* (une plante commune, endémique, très répandue en lisière de forêt, sur les bords des chemins et dans les décombres) et l'ortie *Urtica dioica* (une plante herbacée vivace de la famille des Urticacées, très commune, et très répandue).

Pour cela, nous avons étudié l'effet des extraits se rapprochant le plus de l'usage traditionnel, à savoir les extraits aqueux en utilisant un modèle d'asthme expérimental murin. Tout comme nous avons étudié la composition phytochimiques de ces deux plantes afin de mettre en évidence les molécules antioxydantes (polyphénols) susceptibles de réduire le stress oxydatif auquel sont soumis les rats sensibilisés et rendus asthmatiques.

Ainsi, nous nous proposons dans une première partie théorique de cette présente étude de développer les points suivants :

- La maladie asthmatique : une définition, quelques données épidémiologiques et les facteurs impliqués dans l'expression et le développement de la maladie.
- La Réaction inflammatoire asthmatique, les acteurs cellulaires impliqués et les médiateurs de l'inflammation asthmatique.
- Le stress oxydatif : les systèmes de défenses enzymatiques et non enzymatiques, les dégâts et les biomarqueurs du stress oxydant.
- Les composés phénoliques d'origines végétales : les différentes classes de phénols, les propriétés biologiques et intérêts thérapeutiques.

Dans la partie expérimentale, nous nous proposons d'évaluer :

- L'activité antioxydante et la quantité en polyphénols des extraits de *Borago officinalis* et d'*Urtica dioica*.
- La composition qualitative des extraits des deux plantes par LC MS/MS.
- Les effets cytotoxiques de l'ovalbumine et son implication dans l'induction d'un stress oxydant chez des rats Wistar sensibilisés au cours d'un protocole d'asthme expérimental par l'injection intra-péritonéale de l'allergène puis son inhalation.
- Les effets du traitement de ces rats sensibilisés à l'ovalbumine par les extraits de la bourache et de l'ortie, d'une part, sur l'inflammation bronchique et d'autre part sur le stress oxydatif survenant dans ce modèle murin d'asthme expérimental.

Partie Bibliographique : Chapitre I. L'asthme

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'asthme (du grec *asthmaïnein*, signifiant « être essoufflé ») est une maladie chronique des voies aériennes caractérisée par une inflammation bronchique (Godard et *al.*, 2000). La gravité et la fréquence de la maladie en font un problème de santé publique des plus importants dans le monde. Sa chronicité, engendrant la prescription de médicaments à vie, a donné lieu à l'émergence d'une médecine parallèle basée sur des remèdes naturels.

1.1. Epidémiologie

Le *Global Asthma report* et l'OMS estiment que l'asthme a atteint environ 334 millions de personnes dans le monde en 2012, et que sa fréquence augmente régulièrement depuis 40 ans. Sa mortalité reste inquiétante, avec plus de 250 000 morts par an dans le monde. Il demeure une préoccupation majeure dans les pays en voie de développement pour des raisons économiques et humanitaires. En effet, plus de 80 % des décès dus à l'asthme surviennent dans les pays en développement et près de 8 % de la population souffrirait d'asthme dans la région de la méditerranée orientale (The Global Asthma Report, 2014).

En Algérie, la prévalence de l'asthme est de 3,45% selon une étude menée par Nafti et *al.*, (2009). L'asthme entraîne 1000 décès par an et vient en troisième position après l'hypertension artérielle et le diabète sucré avec une prévalence de 9% et une morbidité de 3,75% (Enquête Nationale Santé -TAHINA-, 2007).

1.2. Facteurs étiologiques de l'asthme

L'asthme est un syndrome multifactoriel. Chaque facteur étiologique de l'asthme est important mais non indispensable. Il est préférable de parler de facteurs déclenchants et de facteurs prédisposants (Godard et *al.*, 2000).

1.2.1. Facteurs prédisposants

Le terrain atopique est le principal facteur responsable de l'asthme. Il s'agit de l'aptitude anormale d'un individu à synthétiser des immunoglobulines E (IgE) spécifiques dirigées contre les allergènes environnementaux. L'atopie est ainsi la première cause de l'asthme, puisqu'elle en est responsable dans environ 80% des cas. En effet, plus de 100 gènes ont été associés à l'asthme (Ober et Hoffjan, 2006). En 2009, 43 gènes ont été confirmés grâce à des études génétiques d'association. La plupart de ces gènes sont des gènes impliqués dans

l'inflammation tels que les interleukines-4, -10 et -13 (IL-4, IL-10 et IL-13), l'interféron (IFN) et le Tumeur Necrosis Factor (TNF) (Weiss et *al.*, 2009).

1.2.2. Les facteurs déclenchants

Bien que l'atopie semble être le paramètre le plus fortement corrélé à son développement, l'asthme demeure une pathologie d'origine multifactorielle. Il peut ainsi être causé par divers facteurs (figure 1), tels que :

- **Les poussières de maison**, constituées d'acariens, de poils d'animaux, de bactéries, de moisissures, de fibres végétales, et responsables d'un grand nombre de cas d'asthme.
- **Les animaux domestiques**, notamment le chat dont les poils et la salive sont très allergisants mais également le lapin, la souris, le rat, le cheval et le chien.
- **Les moisissures** provenant de champignons présents à l'intérieur des maisons, dans les conduits d'aération et de climatisation ainsi qu'autour des conduites d'eau.
- Il existe également toute une série d'aliments qui sont très allergisants pouvant être responsables de crises d'asthme, tels que : l'œuf, le lait de vache, le poisson, les crustacés, les mollusques, les carottes crues, le céleri et les cacahuètes.
- Parmi les allergènes présents dans l'air extérieur, les pollens sont très souvent en cause dans les allergies respiratoires.
- La **pollution atmosphérique** joue également un rôle important dans la maladie. On peut classer dans cette catégorie le tabagisme qui est également un cofacteur important responsable d'une augmentation des taux sériques d'IgE (Baena-Cagnani et *al.*, 2009) et capable de provoquer une inflammation des voies aériennes.
- Les **infections** des voies aériennes par des virus ou des bactéries constituent également un facteur important.
- Les allergènes, dits **professionnels**, présents sur le lieu de travail peuvent entraîner l'apparition de l'asthme, comme la farine de blé pour les boulangers, les poussières de bois pour les ébénistes... etc.
- Enfin, l'**exercice physique**, réalisé dans un milieu où l'air est froid et sec, peut être un facteur provoquant l'asthme d'effort (Butcher, 2006).

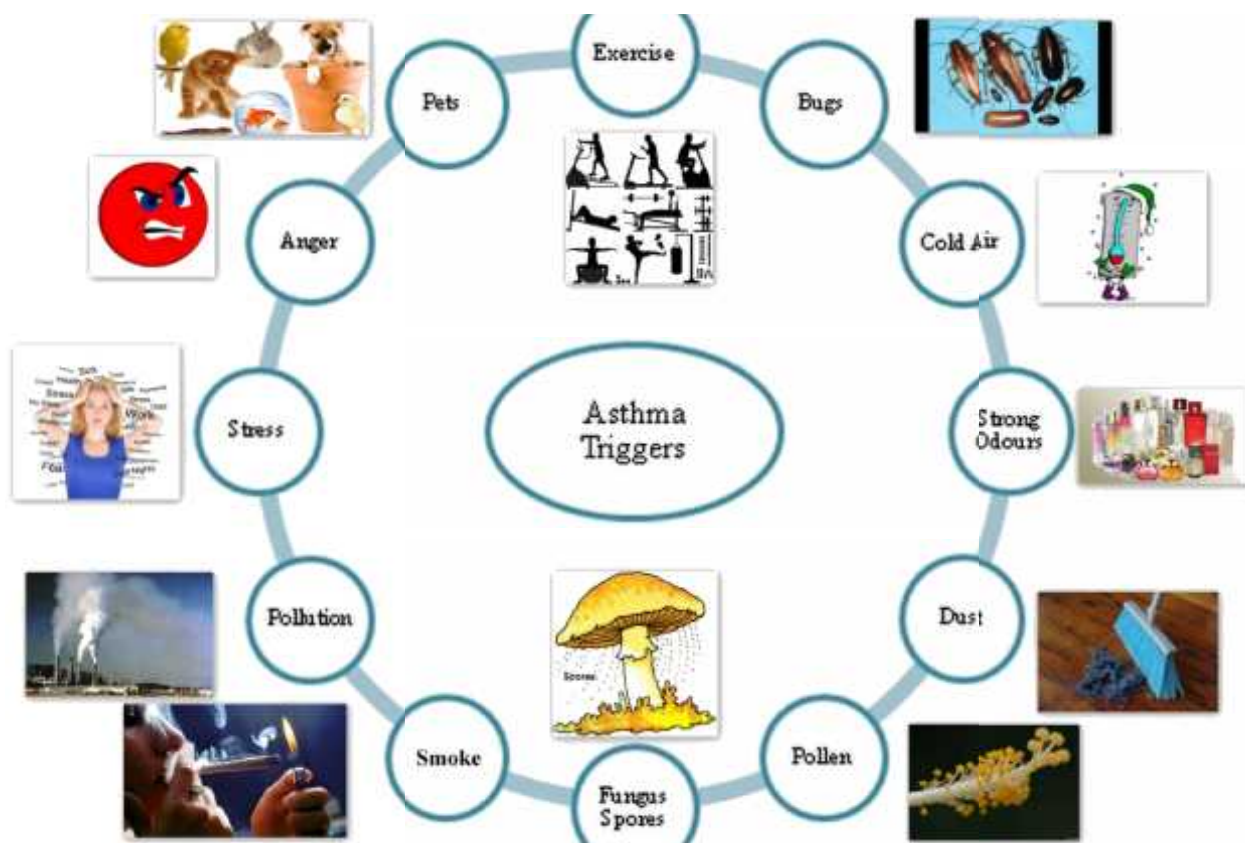


Figure 1. Les différents types de facteurs déclenchant présents dans l'environnement

1.3. Sensibilisation allergénique

L'inhalation de l'allergène par des sujets asthmatiques atopiques provoque une broncho-constriction sous forme d'une réponse biphasique :

- La réponse aiguë à l'allergène, qui se développe 10 minutes après l'inhalation de l'allergène atteint un pic environ 30 minutes après la provocation et disparaît généralement dans les 1 à 3 heures qui suivent.
- Quant à la réponse tardive à l'allergène, elle constitue une seconde période de broncho-constriction qui commence environ 4 à 6 heures après l'exposition à l'allergène et peut durer jusqu'à 12 heures ou plus.

Ce sont les IgE qui interviennent dans la physiopathologie de l'asthme en tant que support de la réaction d'hypersensibilité immédiate. Comme dans toutes les réponses d'hypersensibilité, il existe deux phases immunologiques. Une première phase de sensibilisation / immunisation conduit à la synthèse des IgE spécifiques. Elle est cliniquement muette. La deuxième phase, dite «effectrice», est cliniquement symptomatique, liée à l'activation immédiate par l'allergène des cellules (principalement mastocytes) porteuses des IgE à leur surface (Figure 2).

Au premier contact avec l'allergène (le contact sensibilisant), les cellules dendritiques, présentatrices d'antigène, captent l'allergène, migrent dans les ganglions lymphatiques et le présentent à la sous-population des lymphocytes Th2. Ces derniers activés libèrent l'IL-4 et l'IL-13 qui stimulent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes produisant des IgE spécifiques.

Au deuxième et aux suivants contacts avec l'allergène (les contacts déclanchants de la symptomatologie), la fixation de l'allergène sur l'IgE de la surface du mastocyte et la formation du complexe allergène-IgE déterminent la dégranulation mastocytaire conduisant à -la phase immédiate- la libération de médiateurs préformés stockés dans les granules sécrétoires (histamine principalement, chimiokines et cytokines...) et à la néosynthèse de médiateurs lipidiques et protéiques (les médiateurs lipidiques sont dérivés des phospholipides de la membrane des granulations qui contenaient les médiateurs préformés, représentés essentiellement par des prostaglandines variées et les leucotriènes alors que les médiateurs protéiques sont principalement des cytokines).

La sécrétion à court terme de médiateurs chimiotactiques par les mastocytes, les macrophages alvéolaires et peut-être les cellules épithéliales pourrait aussi être impliquée dans le développement de la réaction tardive à l'allergène qui est caractérisée par un afflux de cellules inflammatoires (lymphocytes et d'éosinophiles surtout), dans le poumon.

Les éosinophiles sont très importants car ils résultent de la libération d'une multitude de médiateurs pro-inflammatoires qui causent la contraction du muscle lisse, l'hyperréactivité bronchique, l'hypersécrétion de mucus, la vasodilatation et l'augmentation de l'écoulement vasculaire avec la production d'un œdème. Ils sont tous caractéristiques des pathophysiologies observées durant la réponse retardée (Strek et Leff, 1997 ; Hoarau et *al.*, 2011).

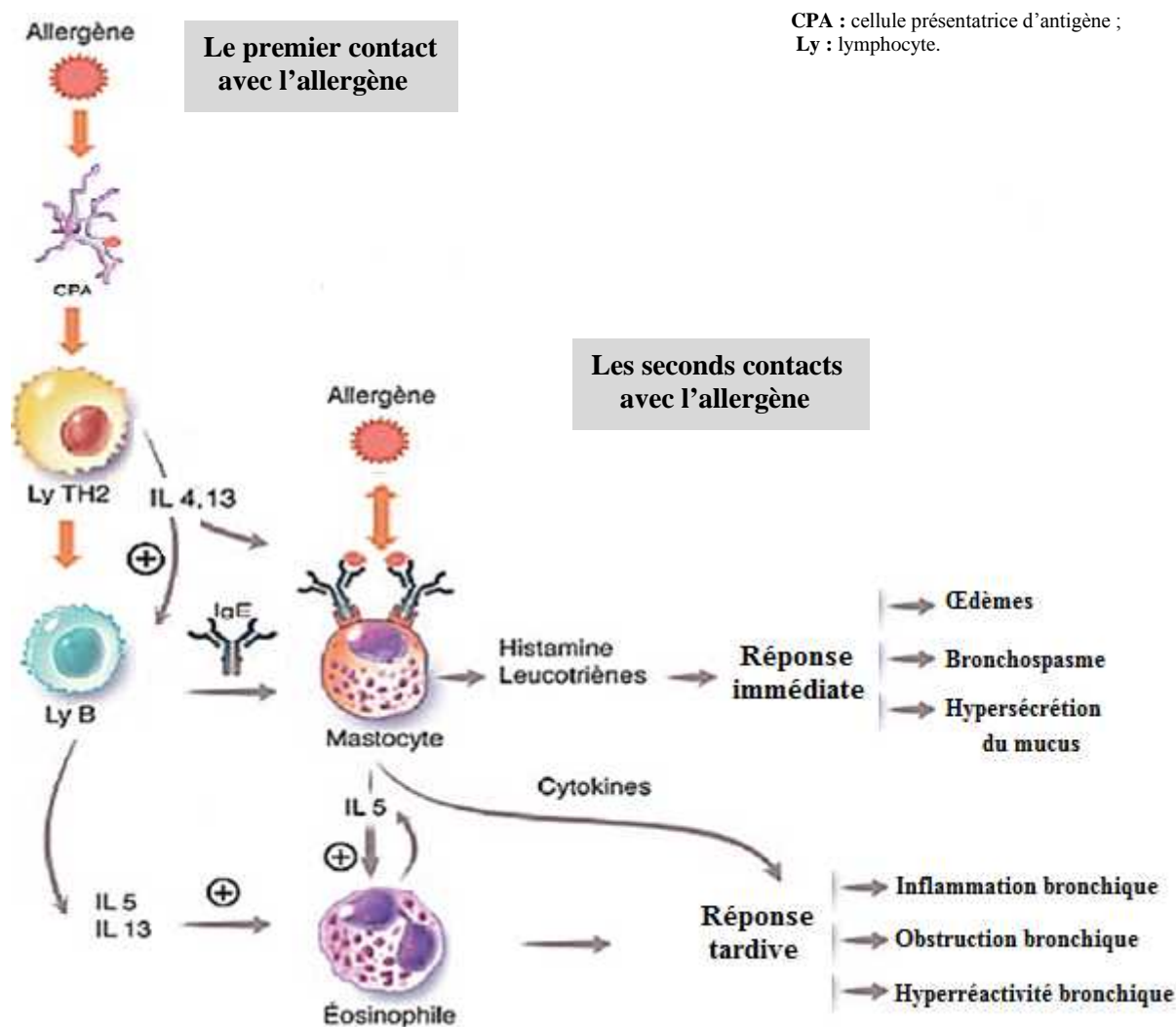


Figure 2. La pathogenèse de l'asthme bronchique (Modifié d'après Girodet et Tunon de Lara, 2007)

1.4. Inflammation et remodelage bronchique

Au niveau bronchique, l'asthme est caractérisé par une inflammation de type Th2 avec une augmentation du nombre d'éosinophiles dans les parois bronchiques, l'inflammation bronchique est quasi constante. L'œdème (composante vasculaire) intéresse l'ensemble des voies aériennes ; il peut se constituer et disparaître rapidement ; il pourrait être responsable des variations rapides du calibre bronchique (Wegmann, 2009) (Figure 3).

Le concept de remodelage bronchique désigne les changements qui surviennent dans les tissus respiratoires du sujet asthmatique, provoquant une obstruction bronchique caractérisée essentiellement par les éléments suivants :

Le muscle lisse bronchique entourant l'ensemble des voies aériennes est hypertrophié chez le sujet asthmatique, ce qui entraîne une obstruction bronchique (mécanique). En effet, des études ont prouvé l'existence d'une hyperplasie dans les grandes voies respiratoires et une hypertrophie tout au long de l'arbre bronchique et en particulier dans les voies périphériques des asthmatiques, mais les mécanismes étiologiques restent inconnus.

Les glandes à mucus sont hypertrophiées et participent à l'augmentation de l'épaisseur de la paroi bronchique en l'obstruant physiquement. De plus, les cellules productrices de mucus favorisent la formation d'un bouchon muqueux et une diminution du débit d'air par l'hypersécrétion de mucus (Kim et *al.*, 1997).

La métaplasie des cellules épithéliales en cellules caliciformes contribue à l'hypersécrétion du mucus.

Malgré d'importants efforts de recherche, les mécanismes qui causent le remodelage des voies respiratoires restent incertains. Cela est dû probablement aux difficultés d'obtenir un ensemble de données à long terme. En outre, la différenciation entre les cytokines, des chimiokines et les cellules inflammatoires responsables de réponses aiguë ou chronique est difficile. Néanmoins, il semble que plusieurs médiateurs inflammatoires sont visiblement en relation avec les processus de remodelage (Minshall et *al.*, 1997).

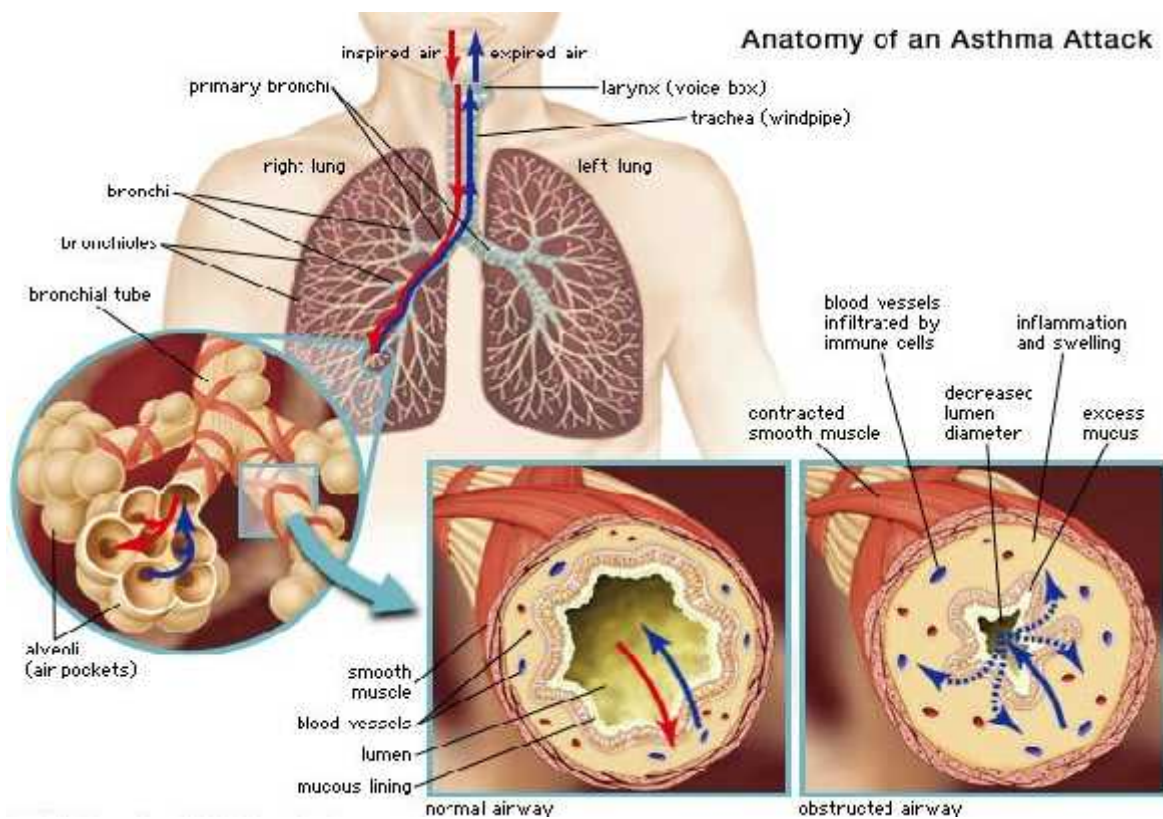


Figure 3. Représentation d'une bronche saine (a) et d'une bronche d'un sujet asthmatique (b)

(Encyclopédie Britannica, 2001).

1.5. Marqueurs de l'inflammation bronchique

1.5.1 Médiateurs de la réponse immunitaire

Il s'agit principalement des médiateurs suivants :

- **Histamine** : il s'agit d'une amine vasoactive stockée dans les granules des mastocytes et des basophiles. Elle a une propriété broncho-constrictrice puissante par son action directe sur les récepteurs H1 exprimés sur les cellules musculaires lisses. Elle entraîne aussi une extravasation vasculaire également dépendante des récepteurs H1, et par conséquent, un œdème muqueux qui participe à l'obstruction bronchique.

L'histamine augmente la perméabilité vasculaire et permet la contraction des muscles lisses localement (Schneider et *al.*, 2005).

- **Cytokines** : Elles peuvent diriger et modifier la réponse inflammatoire dans l'asthme et déterminer probablement sa sévérité. Les cytokines dérivant du Th2 incluant l'IL-5, qui est nécessaire pour la différenciation et la survie des éosinophiles ; l'IL-4 favorise la migration des éosinophiles vers le tissu pulmonaire et leur adhésions aux cellules endothéliales, ainsi que la production de mucus (Temann et *al.*, 1997) et est importante pour la différenciation des cellules Th2. Cette dernière associée avec l'IL-13 sont importantes pour la production d'IgE.

De plus, l'IL-13 qui peut être sécrétée par les lymphocytes T, les mastocytes, les basophiles et les cellules épithéliales des voies respiratoires semble également jouer un rôle dans la réparation des cellules épithéliales ainsi que la métaplasie des cellules caliciformes. L'IL-1 β et le facteur- α de nécrose de tumeur (TNF- α) amplifient la réponse inflammatoire et le facteur stimulant les colonies granulocytaires et les macrophages (GM-CSF) prolongent la survie des éosinophiles dans les voies respiratoires (Izuhara et *al.*, 2009).

- **Chimiokines** : ce sont des cytokines impliquées dans la migration cellulaire et dirigent ainsi la migration des populations leucocytaires requises vers le tissu enflammé. Elles sont sécrétées par de nombreuses cellules sentinelles après stimulation par des signaux de dangers.

- **Les médiateurs lipidiques de l'inflammation** : Lorsque qu'une cellule (phagocyte ou mastocyte) détecte un signal de danger, la phospholipase A2 est activée (*via* la stimulation par le TNF α). Cette enzyme transforme les acides gras de la membrane plasmique de la cellule en leucotriènes, prostaglandines et PAF. Ces composés sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les macrophages, et induisent aussi l'augmentation de la dilatation des vaisseaux et leur perméabilité, facilitant l'arrivée (Diapédèse) des leucocytes sur le site de l'inflammation.

- **Les protéines de la phase aigües** : Elles sont produites par les hépatocytes (cellules du foie) au moment de la phase aigüe de l'inflammation. Nous donnerons ici deux exemples, les deux pentraxines CRP (C-Reactive Protein) et SAP (Serum Amyloid-P). Toutes les deux sont de puissantes opsonines favorisant la phagocytose des pathogènes par les macrophages. La CRP est produite rapidement en réponse à l'IL-6, et son dosage dans le sérum est utilisé en clinique pour diagnostiquer une inflammation (Mayol *et al.*, 2013).

1.5.2. Marqueurs du stress oxydant :

Parmi les marqueurs du stress oxydant pulmonaire, les plus recherchés chez le patient asthmatique sont : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les exhalations condensées, l'oxyde nitrique (NO) dans l'air exhalé ou encore la 8-iso prostaglandine $F_{2\alpha}$ (8-isoPGF $_{2\alpha}$) dans le liquide broncho-alvéolaire (Kirkham et Rahman, 2006). Ils sont générés par les cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages et éosinophiles) ainsi que les cellules résidentes (comme les cellules du muscle lisse et les cellules épithéliales).

En effet, les phénomènes de phagocytose de l'allergène induisent une augmentation de la consommation d'oxygène par ces cellules qui génèrent, par réduction de l'oxygène, des anions superoxyde (O_2^-), lesquels se transforment en H_2O_2 soit spontanément soit sous l'action catalytique de la superoxyde dismutase (SOD) (Leemans *et al.*, 2009). Le H_2O_2 traverse aisément les membranes biologiques, pour se retrouver dans les fluides corporels, notamment le liquide épithélial tapissant la surface des voies aériennes (Figure 4).

Ainsi au niveau de ces membranes se produit une augmentation de la peroxydation de l'acide arachidonique générant les isoprostanes tel que le 8-isoPGF $_{2\alpha}$ qui sont des isomères des prostaglandines générant un stress oxydant pulmonaire.

Par ailleurs, le monoxyde d'azote ou l'oxyde nitrique (NO) est un radical libre produit par oxydation de l'arginine sous l'action d'une famille d'enzymes, les NO synthases ou NOS (Favier, 2003). Parmi ces dernières, certaines sont inductibles et génèrent, au cours de l'inflammation, des quantités importantes de NO dont les propriétés inflammatoires sont : la vasodilatation, l'œdème et l'érythème. En fait, le NO réagit avec l'anion superoxyde (O_2^-) pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Sackesen *et al.*, 2008) (voire chapitre suivant).

D'autre part, l'ampleur du stress oxydatif peut être aussi exprimée par le dosage des antioxydants endogènes, enzymatiques (tels que la SOD, GPx, CAT..) et non enzymatiques (tel que le glutathion) (voire le second chapitre), ces derniers luttent afin de diminuer l'excès de ROS généré.

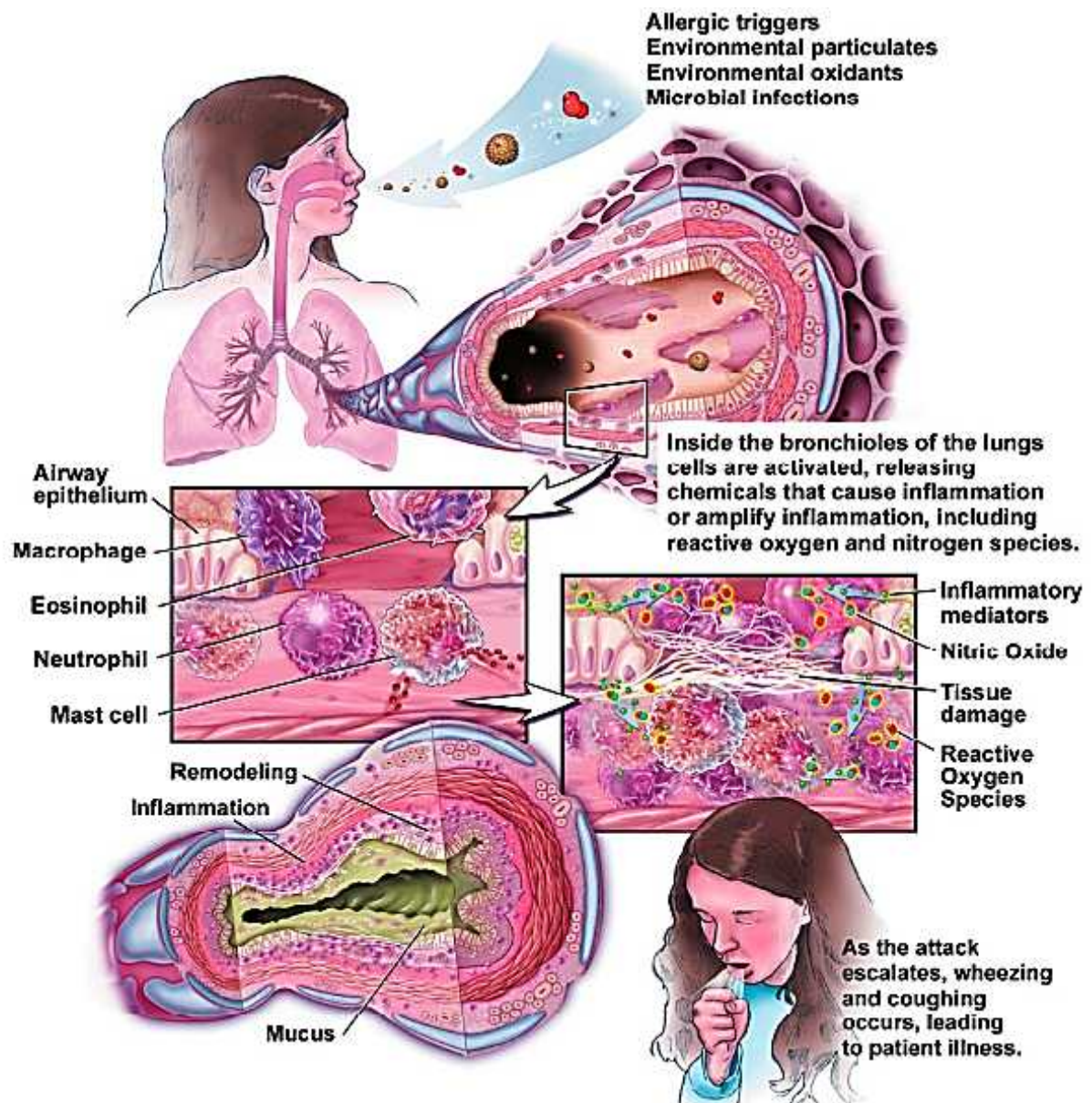


Figure 4. Rôle des radicaux libres oxygénés et des espèces réactives de l'azote dans la physiopathologie de l'asthme

(Sahiner et al., 2011).

Partie bibliographique : Chapitre II. Le stress

Le stress oxydatif, dû à l'excès de radicaux libres, endommage les macromolécules biologiques (ADN, lipides, protéines) perturbant ainsi la machinerie cellulaire et participant activement au déclenchement et/ou au développement de nombreuses pathologies, qui toutefois sont combattues par plusieurs systèmes antioxydants.

1. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairier, déstabilisant ainsi d'autres molécules.

1.1. Les espèces réactives de l'oxygène

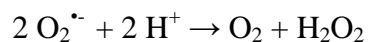
Le métabolisme de l'oxygène génère, intentionnellement ou pas, des espèces chimiques hautement réactives appelées « espèces réactives de l'oxygène (ERO) », parmi lesquelles on trouve des radicaux libres ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , RO_2^{\bullet}) et des espèces non radicalaires (H_2O_2 , RO_2H).

Les espèces oxygénées réactives radicalaires

a. Le radical superoxyde, $O_2^{\bullet-}$

L'anion superoxyde est une ERO primaire, formée par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire. Radical ayant la réactivité la plus faible parmi les radicaux libres du stress oxydant, il est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques (Gardès-Albert et Jore, 2005).

Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène :

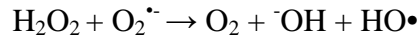


Bien que le radical superoxyde ne soit pas considéré comme particulièrement réactif, son principal danger vient de sa réaction de neutralisation productrice de peroxyde d'hydrogène ou d'acide hypochloreux nettement plus puissants.

La mitochondrie est la source principale d'anion superoxyde dans les cellules en conditions physiologiques. Les peroxysomes ainsi que le cytochrome P450 constituent également des sources endogènes d' $O_2^{\bullet-}$. Il existe également des sources exogènes d'anion superoxyde comme la fumée de cigarette ou les radiations ionisantes particulièrement impliquées dans les pathologies pulmonaires (Lambert et Brand, 2009).

b. Le radical hydroxyle, HO•

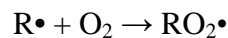
Comme indiqué précédemment, le radical hydroxyle est formé à partir du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton ou à partir de l'anion superoxyde dans la réaction d'Haber-Weiss :



HO• est considéré comme l'ERO la plus réactive. Le radical hydroxyle est produit durant l'inflammation en grande quantité lors des interactions entre l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux, entre l'acide hypochloreux et les ions ferreux (Fe²⁺) ou le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote. Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (Hennebelle, 2006).

c. Les radicaux peroxydes

Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone (R•). Les radicaux R• sont issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons).



Sa réactivité se situe entre l'anion radical superoxyde et le radical hydroxyle.

d. Le radical secondaire alkoxydes RO•

Il est produit suite à la décomposition de l'hydroperoxyde RO₂H, issu de l'oxydation de substrat RH, par des cations métalliques.

Les espèces oxygénées non radicalaires

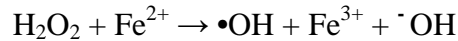
a. L'oxygène singulet ¹O₂,

Il s'agit de la forme diamagnétique¹⁹ de l'oxygène. Il est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Hennebelle, 2006).

b. Le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂

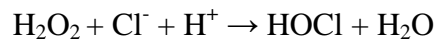
Bien que le peroxyde d'hydrogène ne puisse être considéré comme un radical au sens propre, cette molécule dérivée de l'oxygène joue un rôle central dans le phénomène du stress oxydant. Tout système produisant le radical superoxyde générera par voie de conséquence du

peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est généralement considéré comme une ERO relativement faible mais hautement réactive, en particulier dans sa capacité à réagir avec les ions partiellement réduits Fe^{2+} et Cu^+ formant le radical hydroxyl dans la réaction de Fenton (Wardman et Candeias, 1996) :



c. L'acide hypochloreux, HOCl

Comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux ne rentre pas dans la définition stricte du radical. Cependant, au cours de l'inflammation, la métabolisation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux par l'enzyme MPO (myéloperoxydase : enzyme hémique présentant une activité de chloration) est élevée. Cet acide est un agent chlorant et un oxydant fort.



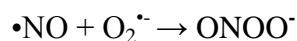
L'acide hypochloreux est considéré comme 100 à 1000 fois plus toxique que le radical superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène (Lenoir, 2011).

1.2. Les espèces réactives de l'azote

Par analogie avec les espèces réactives de l'oxygène, les métabolites dérivés de l'azote sont nommés espèces réactives de l'azote.

a. Le monoxyde d'azote, $\bullet\text{NO}$

Le monoxyde d'azote est produit de manière endogène lors du métabolisme de l'arginine par les « nitric oxide synthases » (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. L'isoforme inductible iNOS de l'enzyme peut être exprimée en réponse aux agents pro-inflammatoires, produisant ainsi de grandes quantités de monoxyde d'azote. Ce dernier se caractérise par une diffusivité élevée, une réactivité limitée et une demi-vie qui n'excède pas quelques secondes, il n'est donc pas particulièrement délétère pour les structures cellulaires. Malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation et ses effets anti-inflammatoires, il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, le cancer et les lésions neuronales dégénératives. De plus, le $\bullet\text{NO}$ peut interagir rapidement avec l'anion superoxyde et produire du peroxyde d'azote beaucoup plus réactif et délétère que ses précurseurs (Blanc et *al.*, 2005).



b. Le peroxy-nitrite, ONOO⁻

Le peroxy-nitrite a une demi-vie plus longue et traverse facilement les membranes lipidiques. Il peut nitrater des résidus de tyrosine et endommager ainsi la fonction des enzymes antioxydants, et les structures protéiques (Sackesen et *al.*, 2008).

2. La production de radicaux libres

2.1. La production intracellulaire

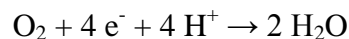
Les origines cellulaires des ERO sont essentiellement enzymatiques et découlent de plusieurs sources. Deux sources majeures sont principalement concernées.

- La première résulte d'imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale qui produit par réduction monoélectronique des ERO.

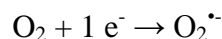
- La deuxième source majeure de production des ERO est constituée par la NAD(P)H oxydase, essentiellement localisée au niveau de la membrane plasmique. La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon la réaction :



Les cytochromes P450, accepteurs terminaux d'électrons du complexe (IV) de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, catalysent la réaction :



Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde :



Compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, cette fuite d'électrons semble devancer les activités de la NAD(P)H. De plus, dans les mitochondries, l'oxydation de coenzymes, telles que les flavoprotéines réduites, s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de la chaîne de transport, sont ensuite transférés à l'O₂ (Delattre et *al.*, 2005).

D'autres sources peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme la xanthine oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde, les peroxysomes qui possèdent plusieurs enzymes sources de peroxyde d'hydrogène et les lipooxygénases, enzymes de la voie de l'acide arachidonique qui permettent notamment la synthèse des prostaglandines, oxydent les acides gras pour donner des hydro-peroxydes d'acide gras insaturés. Les principaux sites de production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont représentés dans la Figure 5.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées (Thérond et Denis, 2005).

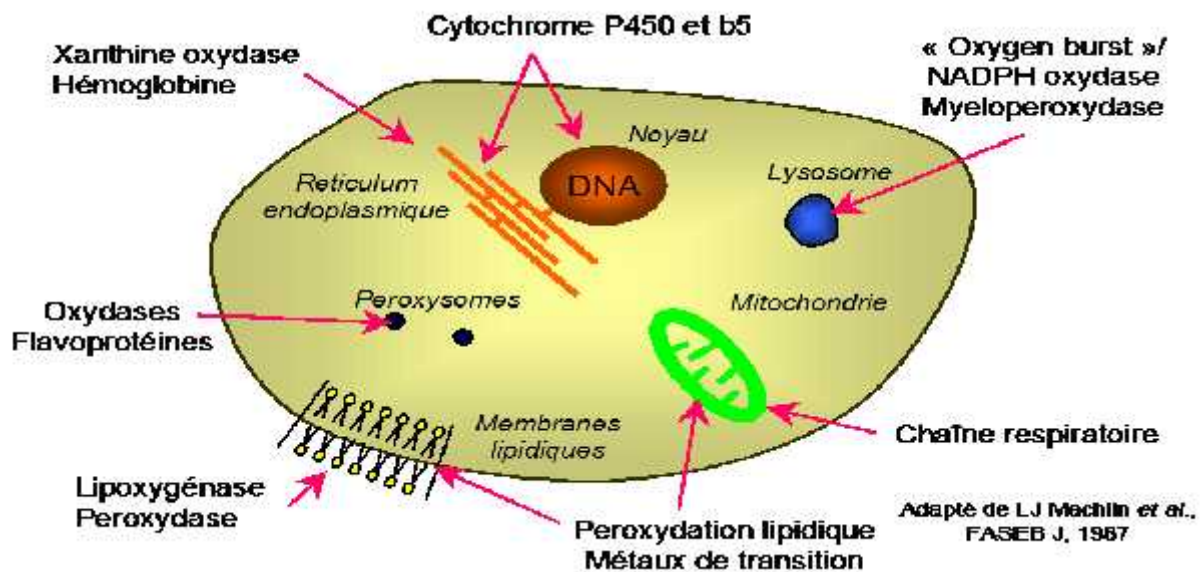


Figure 5. Sites de production intracellulaire des ERO

(adapté de Machlin et Bendich, 1987).

2.2. La production extracellulaire

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre environnement (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels...), ainsi qu'une alimentation « chimiquée » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres. Les rayonnements UV sont capables également de générer des radicaux libres (Mena *et al.*, 2009).

3. Mécanismes d'action des espèces réactives oxygénées et le stress oxydant ou oxydatif

Les EOR et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'elles peuvent être à la fois nocives mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants:

- Bénéfiques, lorsqu'elles sont impliquées dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux.

- Nocives, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense : c'est le stress oxydatif (figure 6).

Les ERO et ERN induisent des atteintes oxydatives sur des composés cellulaires et extra-cellulaires en général proches de leur site de production du fait de leur demi-vie relativement courte (Valko *et al.*, 2006).

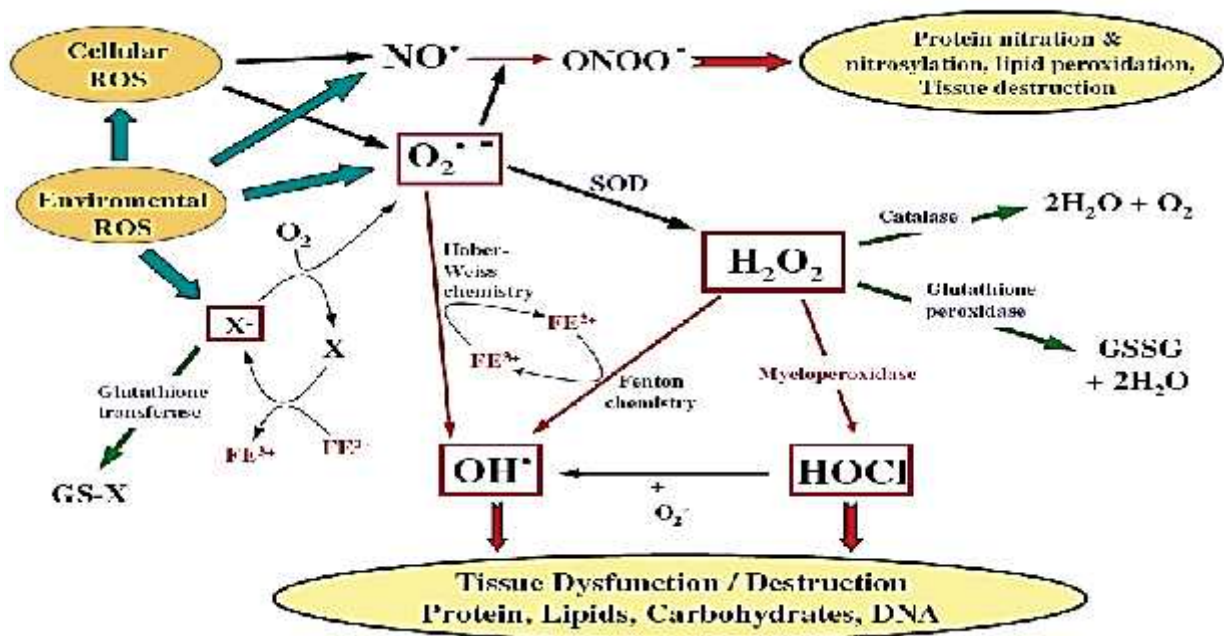


Figure 6. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

(Kirkham et Rahman, 2006).

a. Oxydation des composés lipidiques

Le stress oxydatif concerne tous les constituants cellulaires mais ce sont les lipides qui sont les plus touchés par ce phénomène. Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement visées par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction de peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne, car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Ce processus génère des hydroperoxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques dont l'hydroxynonéal ou le malondialdéhyde (MDA). Ce dernier, dont la structure est représentée dans la figure 7, est le produit le plus étudié de la dégradation des LPO en raison de son caractère mutagène et athérogène (Thérond et Bonnefont-Rousselot, 2005).



Figure 7. Structure chimique du MDA

(Cadet *et al.*, 1998).

Ainsi un unique évènement oxydatif peut altérer de nombreuses molécules lipidiques et induire une accumulation d'hydroperoxydes dans les membranes ce qui réduira leur fluidité ainsi que l'activité des protéines transmembranaires. La réaction en chaîne de la peroxydation lipidique peut être prévenue par la vitamine E (α - tocophérol) intercalée dans la bicouche lipidique des membranes qui joue le rôle de donneur d'hydrogène. En effet, la vitamine E transforme les radicaux peroxydes en hydroperoxydes et met fin à la réaction en chaîne de peroxydation des lipides. Cette dernière étape est alors désignée comme phase de terminaison (Valko *et al.*, 2006) (figure 8).

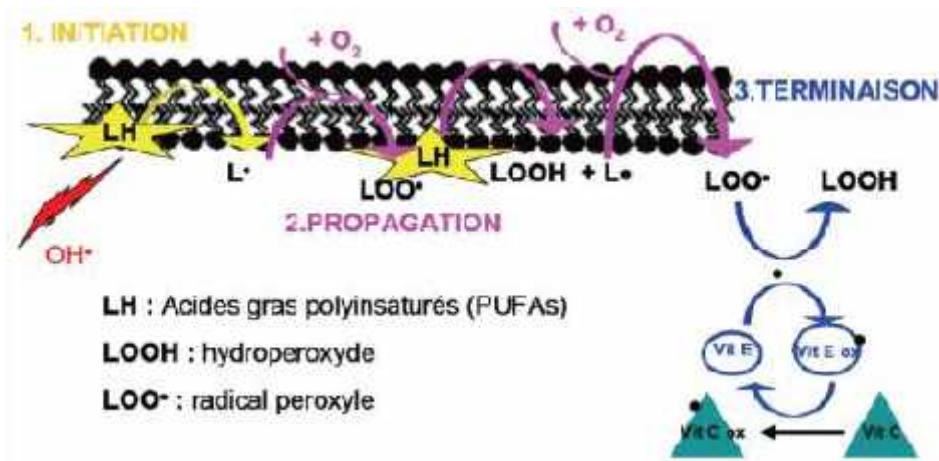


Figure 8. Réactions de la peroxydation lipidique

(Niedernhofer *et al.*, 2003).

b. Oxydation des composés protéiques

Les protéines sont les constituants cellulaires les plus abondants et sont par voie de conséquence des cibles importantes du stress oxydant. La moindre modification structurale d'une protéine peut induire une forte variabilité dans le fonctionnement de celle-ci. Comme pour les lipides, c'est le radical hydroxyle qui est le plus réactif pour induire des altérations oxydatives des protéines introduisant de nouveaux groupes fonctionnels comme des fonctions hydroxyles ou carbonyles qui contribuent aux altérations des fonctions des protéines. L'oxydation induit également des modifications de conformation ainsi que des phénomènes de fragmentation. Ainsi le stress oxydant peut avoir un effet direct sur la fonction propre d'une

protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire (Valko et al., 2006).

c. Oxydation de l'ADN

Les ADN (nucléaire et mitochondrial) sont également des cibles des ERO. Les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques. Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent conduire soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à des erreurs de réplication, soit à une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogenèse. Comme pour les autres composés, la majorité des altérations oxydatives de l'ADN sont induites par le radical hydroxyle. Lorsque le peroxyde d'hydrogène échappe aux enzymes de régulation, il gagne le noyau de la cellule et réagit avec les ions Fe^{2+} et Cu^+ associés à la chromatine produisant ainsi *in situ* le radical hydroxyle qui attaque l'ADN (Valko et al., 2006).

4. Protections cellulaires

La production excessive ou incontrôlée d'espèces oxydantes induit une perturbation du statut redox pouvant induire de sérieuses altérations des structures cellulaires. Il est donc absolument nécessaire que cette production d'ERO et d'ERN soit contrôlée. Pour cela, les cellules disposent de systèmes de défenses antioxydantes classées en antioxydants enzymatiques ou non-enzymatiques (figure 9).

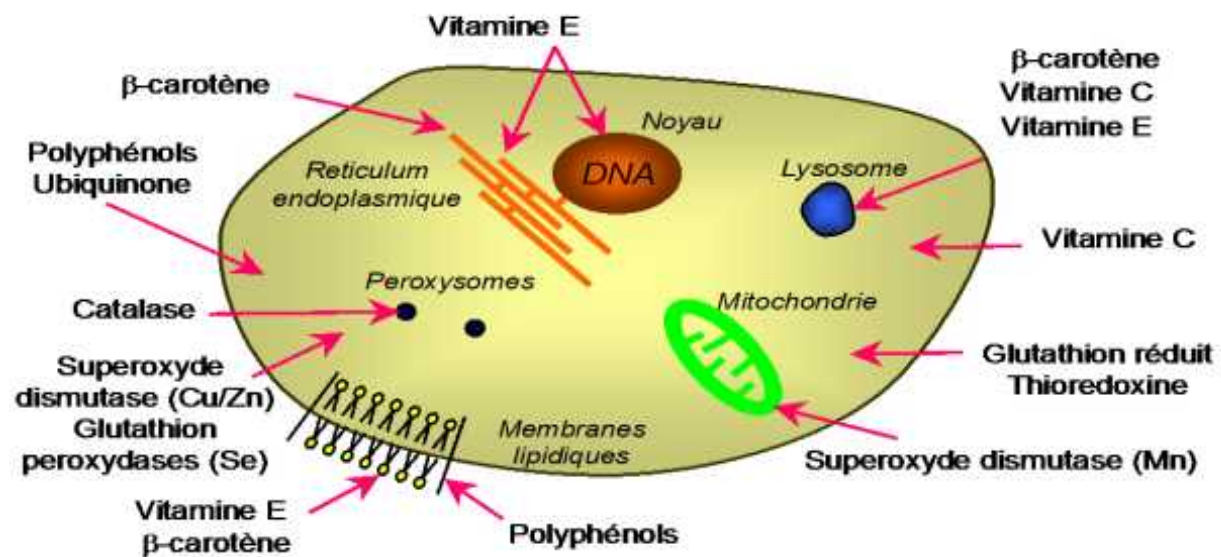


Figure 9. Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires

(adapté de Machlinet et Bendich, 1987).

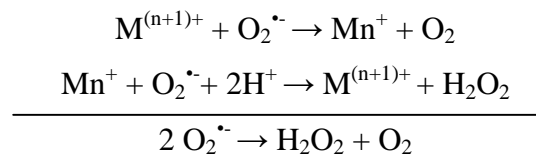
4.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques représentent la composante la plus importante des systèmes de défenses cellulaires contre les attaques oxydatives.

a. Les superoxyde dismutases (SOD):

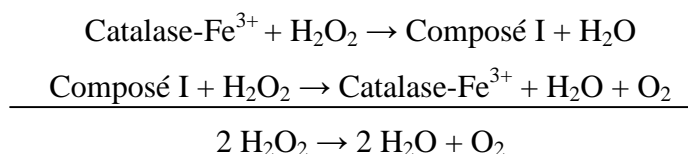
Ce sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène 10000 fois plus rapidement que la dismutation spontanée de l'anion superoxyde.

Ces enzymes sont largement distribuées dans l'ensemble des organismes vivants. Selon le cofacteur métallique présent dans le centre actif et le nombre de sous-unités constituant l'enzyme, on distingue quatre isoformes : la SOD à cuivre et à zinc (SOD1), la SOD à manganèse (SOD2), la SOD à cuivre et à zinc extracellulaire (SOD3) et la SOD à nickel récemment décrite. Le mécanisme catalytique des SOD est un mécanisme en « ping-pong » impliquant une étape de réduction suivie d'une oxydation de l'atome métallique (M) concomitantes à l'oxydation puis à la réduction de radicaux superoxydes (Théron et Denis, 2005 ; Valko *et al.*, 2006):



b. La catalase (CAT) :

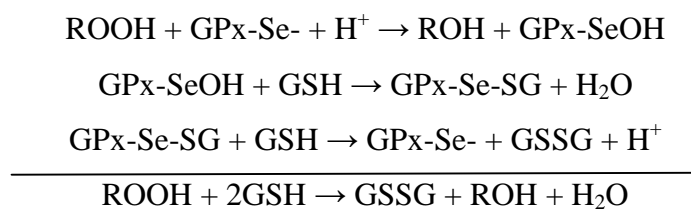
Il s'agit d'une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et les érythrocytes. Elle est formée de quatre sous-unités, chacune comportant un groupement ferriprotoporphyrine avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} . La réaction se déroule en deux étapes : dans un premier temps, une molécule de peroxyde d'hydrogène oxyde l'atome de fer de l'enzyme et forme un groupement oxyferryle avec un radical porphyrine nommé composé I ; dans un second temps le composé I oxyde une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène. L'enzyme peut être inactivée par le peroxyde d'hydrogène à des concentrations supérieures à 100 μM (Théron et Denis, 2005; Valko *et al.*, 2006).



Son activité est la plus importante dans les globules rouges et les hépatocytes (Théron et Denis, 2005).

c. Les glutathion peroxydases (GPx):

Elles jouent le même rôle catalytique que la catalase, à savoir la détoxification du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques en couplant leur réduction à l'oxydation d'un substrat réducteur, le glutathion. Les différentes isoenzymes (5 isoformes, GPx1 à 4 et GPx6) contiennent dans leurs sous-unités (une ou quatre selon l'isoforme) un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine. Elles fonctionnent toutes selon un même schéma catalytique :



La GPx présente une meilleure affinité pour le peroxyde d'hydrogène que la CAT, mais n'en est pas spécifique et peut réagir avec des hydroperoxydes d'esters de cholestérol ou de phospholipides membranaires, de lipoprotéines ou d'ADN. Par contre, la GPx est spécifique de son cofacteur, le glutathion (Théron et Bonnefont-Rousselot, 2005 ; Valko et *al.*, 2006).

4.2. Les antioxydants non-enzymatiques

a. Systèmes antioxydants endogènes :

Ces systèmes antioxydants incluent la bilirubine, l'acide urique et de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion (GSH). Ce dernier est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Avec son groupement sulfhydryle, il est le thiol majoritaire au niveau intracellulaire et est essentiellement présent sous forme réduite (la concentration de la forme oxydée dissulfure GSSG est au moins 10 fois plus faible). Le GSH joue son rôle d'antioxydant en tant que substrat d'enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases (GPx), mais également grâce à ses propriétés intrinsèques. En effet, le glutathion prévient l'oxydation des groupements thiols par le biais de son pouvoir réducteur. Il peut également chélater les ions cuivreux Cu^+ et limiter ainsi leur participation à la réaction de Fenton. Il est directement impliqué dans la réparation des atteintes oxydatives de l'ADN (Théron et Denis, 2005).

b. Systèmes antioxydants exogènes

Les vitamines : Parmi lesquelles la vitamine E, qui englobe une famille composée des tocophérols et des tocotriénols (voir annexe 1), et dont la forme la plus active, l' α -tocophérol, est le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes. Situé dans les lipoprotéines et les membranes, l' α -tocophérol est capable de piéger l'oxygène singulet et de réagir avec le radical hydroxyle pour former le radical tocophéryle. Parmi les vitamines il y a également la vitamine C (voir annexe 1). Fréquemment présente sous forme d'ascorbate, elle est considérée comme l'antioxydant le plus important des fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace de l'ensemble des ERO. Elle réagit particulièrement avec les peroxydes aqueux en formant le radical ascorbyle ce qui protège les lipoprotéines et les membranes de la peroxydation lipidique (Valko et *al.*, 2006).

Les caroténoïdes : Ce sont des pigments issus des plantes et des microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO•, HO•, O₂•-, R• par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko et *al.*, 2006) (voir annexe 2).

Les composés phénoliques en particulier les **flavonoïdes**, sont des métabolites secondaires des plantes. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (voir chapitre suivant) (Leopoldini et *al.*, 2011) (voir annexe 3).


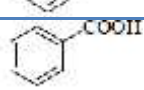
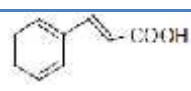
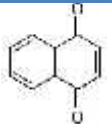
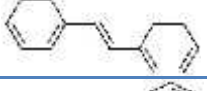

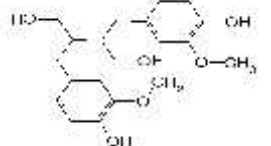
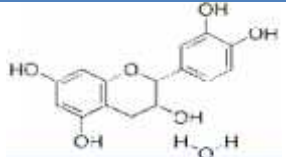
Partie bibliographique : Chapitre III. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus végétaux et contribuent à la qualité organoleptique (couleur, astringence, arôme, amertume) et nutritionnelles des aliments qui en contiennent. De plus, ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques au niveau des végétaux ce qui leur confère, en tant qu'aliment, un rôle protecteur contre certaines pathologies du fait de leur effet "scavenger" puissant des radicaux libres.

1. Classification chimique

Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou de plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure. Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné (Tomas-Barberan et Clifford, 2000) (Tableau 1).

Tableau I. Principales classes des composés phénoliques

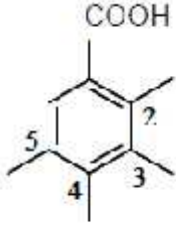
Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure de base ou exemple
C ₆	Phénols simples	Cathécol	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	Acide salicylique	gallique, 
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamique Coumarines	Acide caféique, férulique Ombelliférone	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone, plumbagine	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Quercétine Kaempférol	
C ₆ -C ₃ -C ₃ -C ₆	Lignanes	<i>Secoisolariciresinol</i> →	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	Cyanidol →	

1.1. Les acides phénoliques

On distingue deux classes d'acides phénoliques : les dérivés de l'acide benzoïque ou acides hydroxybenzoïques et les dérivés de l'acide cinnamique ou acides hydroxycinnamiques.

1.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Présents dans peu de végétaux de l'alimentation courante, ils sont peu étudiés. Dérivés de l'acide benzoïque, leur diversité structurale est due aux hydroxylations et/ou méthoxylations du noyau aromatique en diverses positions (2, 3 et 4) donnant ainsi les acides 4-hydroxybenzoïque, 3-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique et gentisique (Tomas-Barberan et Clifford, 2000) (figure 10).

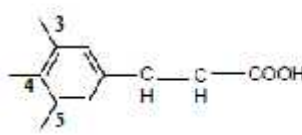


Composés	2	3	4	5
Acide 4-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
Acide 3-hydroxybenzoïque	H	OH	H	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
Acide gallique	H	OH	OH	OH
Acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentisique	OH	H	H	OH

Figure 10. Structure des acides hydroxybenzoïques

1.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Très répandus dans le règne végétal, le composé le plus courant est l'acide caféique. Les acides férulique, sinapique et 4-coumarique sont également répandus dans les aliments (Tomas-Barberan et Clifford, 2000). Les acides hydroxycinnamiques sont rarement présents sous forme libre et sont retrouvés essentiellement sous une forme conjuguée. Il s'agit de dérivés glycosylés ou d'esters avec les acides quinique, tartrique ou shikimique (Macheix et *al*, 2006) (figure 11).



Composés	3	4	5
Acide cinnamique	H	H	H
Acide 4-coumarique	H	OH	H
Acide 3-coumarique	OH	H	H
Acide caféique	OH	OH	H
Acide férulique	OH	OCH ₃	H
Acide iso férulique	OCH ₃	OH	H
Acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figure 11. Structure des acides hydroxycinnamiques

1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation et plus de 4000 composés ont pu être identifiés. Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits. Il existe dans chaque sous-classe de nombreux

composés selon les substitutions des cycles aromatiques (figure 12). La plupart des flavonoïdes sont glycosylés, ce qui augmente leur solubilité dans l'eau.

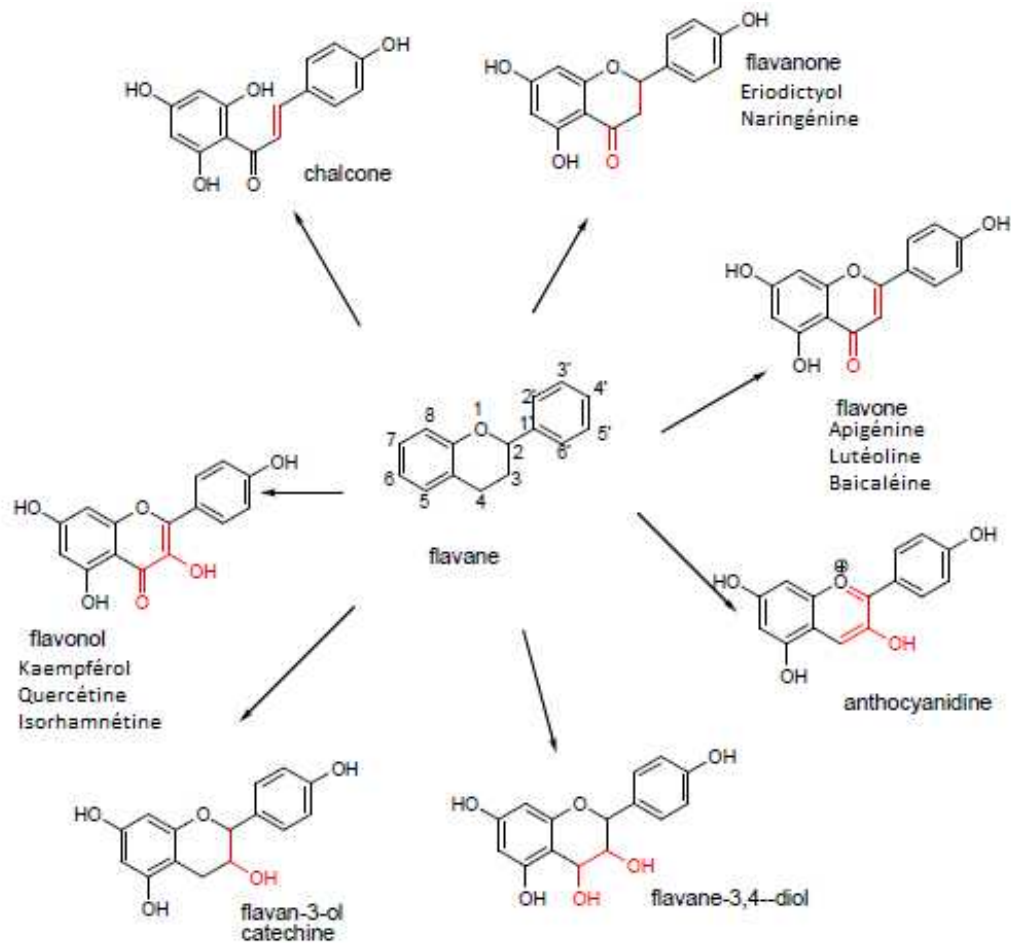


Figure 12. Les différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane

1.2.1. Les 4-oxoflavonoïdes

a. Les flavones : moins répandues dans les fruits et légumes que les flavonols, les flavones sont principalement présentes sous forme de glycosides de lutéoline et d'apigénine.

b. Les flavonols : ce sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal à l'exception des algues et des champignons. Les composés principaux sont le kaempférol, la quercétine, l'isorhamnétine et la myricétine.

c. Les flavanones : Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron. La position 7 est le siège de la glycosylation (El Gharras, 2009).

d. Les isoflavones : Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, qui peuvent être glycosylés ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses.

1.2.2. Les chalcones

Les chalcones sont peu présentes dans l'alimentation en raison de leur transformation en flavanones en milieu acide, principalement au cours des étapes d'extraction (Tomas-Barberan et Clifford, 2000).

1.2.3. Les flavanols

Les flavanols existent sous forme de monomères également appelés catéchines ainsi que sous forme de polymères, les proanthocyanidines. La catéchine et l'épicatéchine sont les flavanols principaux présents dans de nombreux fruits, tandis que gallocatéchine, épigallocatéchine et épigallocatéchine gallate sont plus spécialement présents dans le thé (El Gharras, 2009).

1.2.4. Les anthocyanes

Les anthocyanes constituent le groupe de pigments solubles dans l'eau le plus important. Ils sont dissous dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs et des fruits auxquels ils donnent des couleurs rose, rouge, bleue et violette (El Gharras, 2009).

1.3. Tanins

Ils sont classifiés en tanins hydrolysables : les gallotanins (acide gallique et glucose), les ellagitanins (acide hexahydroxydiphénique) et en tanins condensés (non hydrolysables) plus répandus dans le règne végétal. ils peuvent être des dimères, des oligomères et des polymères de catéchine (Tarascou et *al.*, 2011).

2. Propriétés biologiques et intérêts thérapeutiques

Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (cancers, ostéoporose, maladies cardiovasculaires, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental.

2.1. Propriété antioxydante des polyphénols

Les altérations oxydatives de molécules telles que les lipides, les protéines ou l'ADN sont impliquées dans de nombreuses pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, les phénomènes inflammatoires, le diabète. Un antioxydant biologique se définit comme « une substance qui, lorsqu'elle est présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat ».

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols sont considérés comme éliminateurs de radicaux libres. C'est leur structure chimique aromatique qui permet une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires (Shahidi et Naczk, 2003).

Activité antioxydante des flavonoïdes

Pokorny et *al.*, (2001) montrent que l'activité antioxydante des flavonoïdes dépend en général de plusieurs critères:

- La structure ortho-dihydroxyle sur le cycle B (figure 13,a),
- La présence de la double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo (figure 13,b),
- Le groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃ (figure 13,c),
- Du nombre et de la position des groupes hydroxylés.
- La présence de glycolisation ou de méthylation.

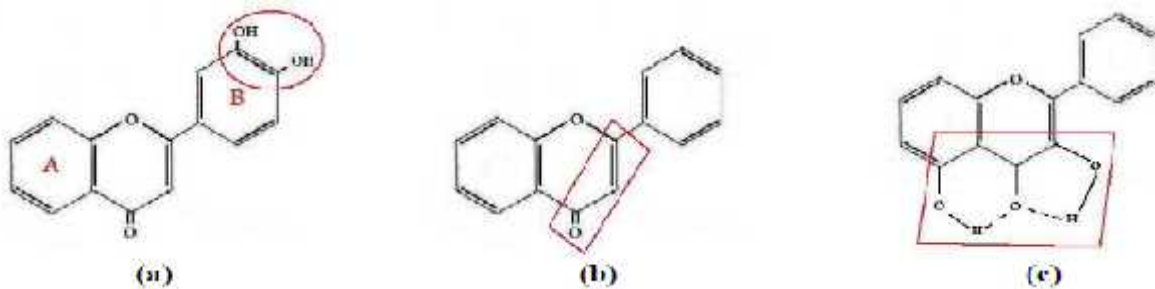


Figure 13. Relation de l'activité antioxydante avec la structure des flavonoïdes

(Pokorny et *al.*, 2001).

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans le processus de régulation du stress oxydant (Pietta, 2000 ; Cotelle, 2001) :

Capture ou piégeage direct des ERO

Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres tels que l'anion superoxyde et les radicaux : hydroxyle, alkoxyde, peroxyde par le transfert d'hydrogène et le radical flavonoïde phenoxy ($Fl-O\cdot$) qui en résulte peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (Procházková et *al.*, 2011) (figure 14).

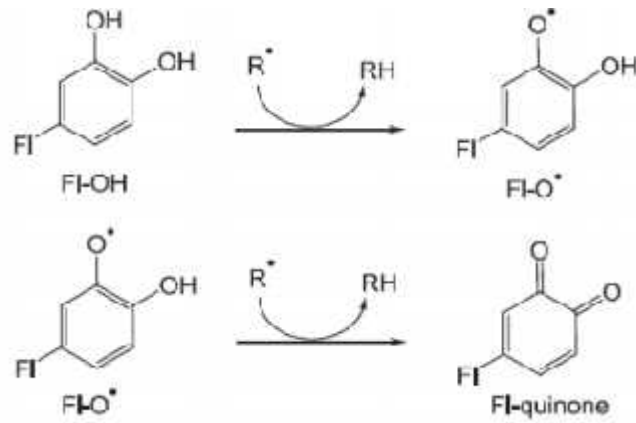


Figure 14. Piégeage des ROS (R.) par les flavonoïdes (FI-OH) pour former un radical flavonoïde phenoxy (FI-O.), qui à son tour réagit avec un autre ROS pour donner une structure quinone stable

(Pietta, 2000).

Chélation des ions métalliques :

Les flavonoïdes ont la capacité de former des complexes stables avec les ions métalliques (figure 15) et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production des ERO. C'est grâce à leurs structures chimiques qu'ils sont de bons chélateurs d'ions métalliques et les sites essentiels pour la chélation sont (Engelmann, 2005):

- Un noyau catéchole sur le cycle B,
- Les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C,
- Les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.

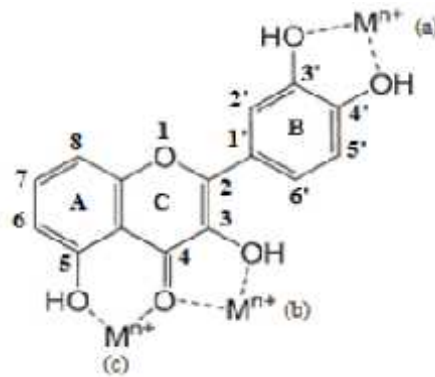


Figure 15. Les sites du flavonoïde proposés pour la chélation des ions métalliques (Mⁿ⁺): (a) un noyau catéchol sur le cycle B, (b) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (c) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C

(Pietta, 2000).

Inhibition des enzymes

La xanthine oxydase catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette réaction (figure 16) est considérée comme une source biologique des

ERO. Elle s'accompagne de la génération de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène à partir du dioxygène.



Figure 16. Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase

(cotelle, 2001).

Les flavonoïdes interviennent par le piégeage du radical issu du processus enzymatique ou par l'inhibition de l'enzyme.

Inhibition de la peroxydation lipidique

Les flavonoïdes interviennent dans le mécanisme d'inhibition de la peroxydation lipidique par :

- Piégeage directe des radicaux alkoxydes et peroxydes ou interruption du processus de propagation et arrêt de l'oxydation en chaîne.
- Régénération de l' α tocophérols pendant la réduction du radical α tocophéryl.

Activité antioxydante des acides phénoliques

De la même manière, l'activité antioxydante des acides phénoliques dépend de leur degré d'hydroxylation. De plus, il a été montré que les acides hydroxycinnamiques étaient plus antioxydants que les acides benzoïques correspondants (Shahidi et Naczk, 2003).

2.2. Polyphénols et inflammation

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation (Santangelo et *al.*, 2007 ; Guo et *al.*, 2009).

Des études menées *in vitro* ont montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibaient la production de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. que la quercétine inhibait la production de TNF- α par les macrophages et que le kaempférol inhibait l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IL-6 dans les mastocytes (Gonzalez-Gallego et *al.*, 2010).

2.3. Polyphénols et activité antiasthmatique

Plusieurs études ont reporté une association entre l'asthme et une nutrition riche en antioxydants (vitamine E, vitamine C, caroténoïdes, sélénium, polyphénols) (Allan et Devereux, 2011)

En effet, des études pré-cliniques *in vitro* ont montré les effets bénéfiques de la quercétine dans l'asthme, en inhibant notamment l'obstruction bronchique et l'hyperréactivité bronchique (Lambert et *al.*, 2005). Par contre, d'autres flavonols comme la quercitrine et l'hypéroside se sont révélés inactifs (Chaabi, 2008)

D'autre part, plusieurs études *in vivo* ont aussi montré l'effet anti-asthmatique des polyphénols sur des modèles d'asthmes murins (Kandharea et *al.*, 2013 ; Kim et *al.*, 2010).

Chez l'adulte, la consommation de pommes a été associée avec une probabilité de réduire les symptômes de l'asthme (Shaheen et *al.*, 2001). Chez les enfants, une consommation quotidienne de jus concentré de bananes et de pommes est associée à une réduction de la respiration sifflante (Okoko et *al.*, 2007), ainsi que la consommation de kiwis et d'agrumes. D'autre part, l'alimentation méditerranéenne, riche en polyphénols, a été associée à une réduction du risque d'asthme et de la respiration sifflante chez les enfants (De Batlle et *al.*, 2008).

Partie expérimentale : Matériel et méthodes

But et objectifs

Le but de cette recherche est de confirmer l'utilisation de certaines plantes locales à visée antiasthmatique soulageant l'inflammation bronchique. Pour ce faire, deux plantes endémiques, très répandues et traditionnellement utilisés contre les symptômes asthmatiques ont été choisies : *Borago officinalis* et *Urtica dioica*. Nous avons donc tenté de prouver si l'utilisation traditionnelle des extraits (aqueux/infusion) de ces deux plantes contre l'asthme pouvait être justifiée expérimentalement.

Dans un premier temps, un des objectifs de cette thèse a été d'identifier les principaux composés phytochimiques, tout en mettant en exergue le pouvoir antioxydant de chacune des deux plantes comparativement à un extrait hydro-alcoolique et ce par :

- Dosages colorimétriques des polyphénols.
- Etude de l'activité antioxydante.
- Identification des composés (principalement des polyphénols) par LC MS/MS.

Ensuite, un second objectif a été d'étudier l'effet des extraits aqueux de ces deux plantes sur des rats sensibilisés via un protocole d'asthme expérimental schématisé ci-dessous (figure 17), en mesurant leurs impacts sur :

- La peroxydation lipidique à travers le dosage du MDA au niveau du sang (érythrocytes) et des organes clés (foie et poumon).
- Les différents systèmes antioxydants (GSH, GPx, SOD, CAT) et ce au niveau des mêmes compartiments précédemment cités.
- Quelques marqueurs de l'asthme et de l'inflammation (dosage des leucocytes, de l'interleukine-4).
- L'architecture tissulaire pulmonaire.

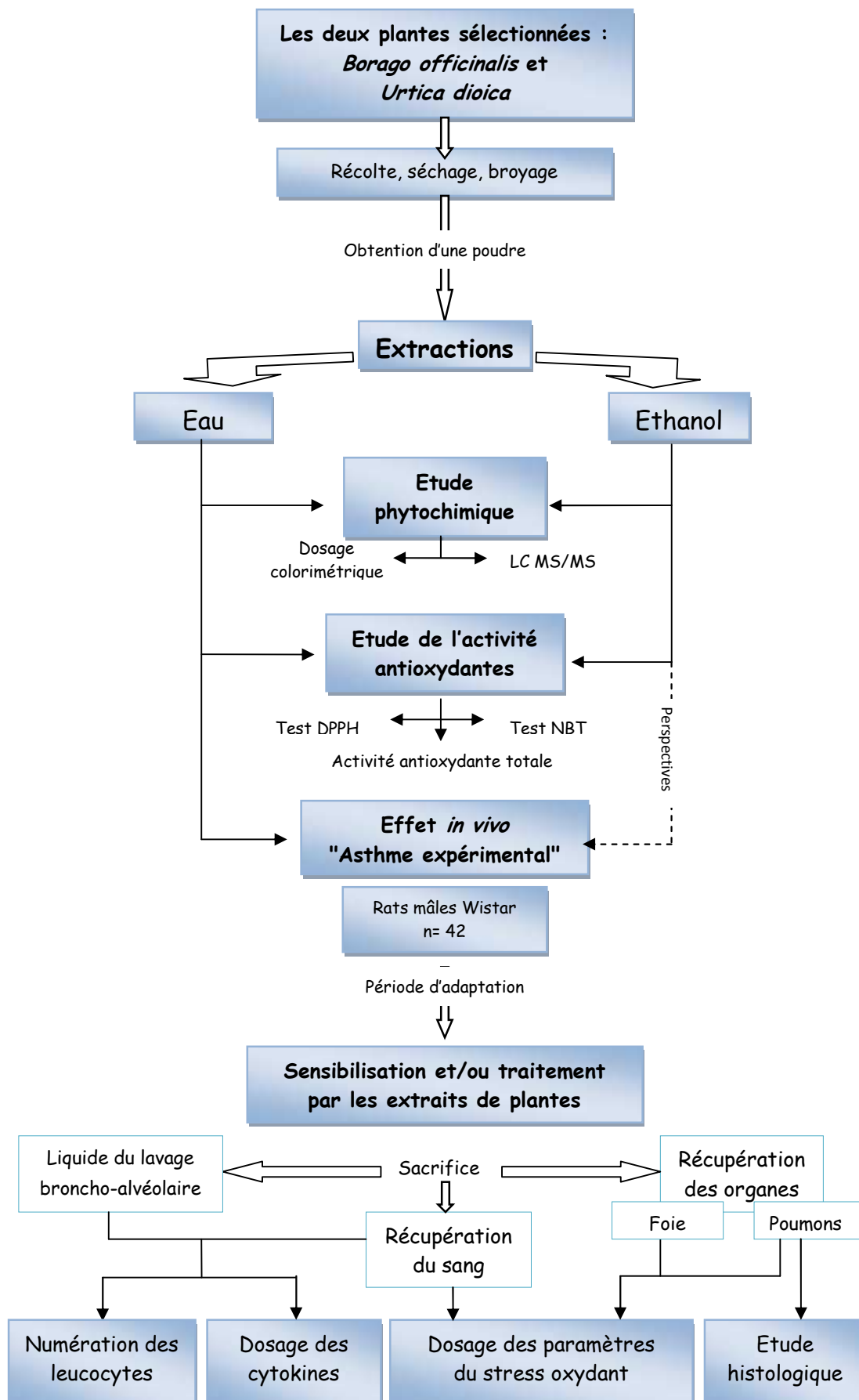


Figure 17. Schéma récapitulatif du protocole expérimental

1. Etude de la composition chimique & des propriétés anti-oxydantes des plantes choisies

1.1. Monographies des deux plantes étudiées

1.1.1. La bourrache *Borago officinalis* L.

La bourrache, borage en anglais et en arabe, est une plante de la famille des Borraginacées, répandue dans tout le bassin méditerranéen (Beloued, 1998). Son nom vient de l'arabe ابو رش (père de la sueur), qui fait référence à ses propriétés sudorifiques. En latin, *burra* signifie « étoffe à poils longs » et se rapporte à l'aspect velu de la plante. Son nom botanique *borago* vient du latin *cor ago* qui signifie « je stimule le cœur » (Dufresne et *al.*, 2010).

Il s'agit d'une plante annuelle de 20 à 70 cm de hauteur, entièrement couverte de poils raides et piquants, ayant une tige épaisse, creuse, arrondie et striée longitudinalement (Figure 18). Les larges feuilles alternes portent de longs poils hérissés sur toute leur surface, ce qui est propre à la famille des borraginacées. Les parties vertes de la plante dégagent une forte odeur de concombre. Elle produit en abondance de petites fleurs en forme d'étoiles passant du violet au bleu ciel, puis au rose lorsqu'elles commencent à décliner. Celles-ci sont comestibles, mais doivent être détachées du calice velu à cinq sépales et des akènes regroupés en quatre graines au centre de la fleur. Le fruit est formé d'akènes verruqueux. La floraison s'étale généralement de Mars à Mai. Les graines brunes noirâtres dépourvues d'albumen parviennent à maturité de façon graduelle. Les fleurs sont auto-stériles et la pollinisation doit être assurée par les insectes.

Cette plante commune, endémique, est très répandue en lisière de forêt, sur les bords des chemins et dans les décombres. Elle peut même se trouver dans de nombreux jardins et jusqu'à 1500m d'altitude. Il s'agit d'une plante à comportement héliophile, mais appartenant à une espèce qui supporte un demi-ombrage. Elle « aime » les sols assez riches en bases au pH proche de la neutralité et ayant de bonnes réserves en eau (Beloued, 1998 ; Dufresne et *al.*, 2010).

A notre connaissance, seule l'étude de Giri et *al.* (2012) a rapporté qu'une dose 2g/kg d'extrait éthanolique de BO pouvait causer des effets secondaires et une mortalité chez des souris.



Figure 18. *Borago officinalis*, bourrache, borage, de la famille des Borraginacées

(Milcent, 2011)

1.1.2. L'ortie *Urtica dioica* L.

L'ortie ou nettle en anglais et الحريقة en arabe est une plante de la famille des Urticacées, originaire des régions tempérées de l'Eurasie. Le terme *Urtica* vient de « urere » qui signifie brûler en latin, ce qui fait référence aux poils brûlants et irritants portés par la plante. Quant au mot *Dioica*, il signifie « dioïque » et qualifie une espèce de plante dont les fleurs mâles et femelles sont portées par deux pieds (plantes) différent(e)s.

Il s'agit d'une plante herbacée vivace, mesurant de 0,6 à 1,2 m de haut à tiges robustes dressées, à feuilles opposées, ovoïdes et acuminées, recouvertes de poils urticants et hérissés (Figure 19). La pointe de ces poils durs et coniques se brise lors d'un contact et injecte des substances urticantes contenues dans un massif cellulaire situé à la base. Sur la face inférieure des feuilles, les nervures sont très proéminentes. Le bord de la feuille est pourvu de dents aiguës. La floraison peut aller de Mars jusqu'à Mai. Les fleurs unisexuées (parfois bisexuées), verdâtres, forment de longues grappes dressées, rameuses et disposées à l'aisselle des feuilles. Le fruit est un akène (Wichtl et Anton, 2003).

Urtica dioica L. est l'espèce la plus grande et la plus répandue. D'un vert sombre, elle est très commune, et est présente dans presque toutes les régions du monde: de l'Europe et

l'Afrique du Nord à l'Asie, ainsi que l'Amérique du Nord et du Sud et en Afrique du Sud. Elle est aujourd'hui naturalisée sur tous les continents où il y a des zones tempérées. Très répandue dans le Tell Algérien, elle peut être présente jusqu'à 2400 mètres d'altitude.

L'ortie «aime» les sols frais et légers, l'ensoleillement lui semble indifférent puisqu'on la trouve aussi bien en plein soleil à l'abri d'une façade qu'au fond d'un vallon ombragé. Elle supporte tous les sols, surtout ceux contenant des matières organiques fraîches; elle fait partie des plantes nitrophiles.

La recherche dans les bases de données médicales et toxicologiques n'a révélé aucun effet indésirable grave lorsque les doses orales usuelles recommandées sont respectées. Plusieurs publications ont reporté que les contre-indications étaient inconnues et que les effets secondaires, pour la plupart des désordres gastro-intestinaux, étaient rares (Kavalali, 2003). La DL₅₀ d'un extrait aqueux d'ortie a été déterminée à 3,5 g/kg (Bnouham et al., 2003).



Figure 19. L'ortie, *Urtica dioica*, nettle, de la famille des Urticacées

(Milcent, 2011).

1.2. Cueillette du matériel végétal

La cueillette de *Borago officinalis* et *Urtica dioica* a été effectuée en Avril 2012 puis une seconde fois en avril 2013 dans la ville d'Annaba et plus précisément à Sidi Aissa (figure 20). Cette zone semi-urbaine, située au nord de l'agglomération d'Annaba (Latitude: 36 55030.8400N / Longitude: 7 44,052,5600E) est faiblement urbanisée et à très faible trafic.

L'identification des deux plantes a été faite par le Pr Azedinne CHEFROUR, botaniste à la faculté de médecine et de pharmacie d'Annaba.

Après les avoir cueillies, selon les bonnes pratiques de récoltes relatives aux plantes médicinales, les feuilles ont été prises au hasard puis séchées une quinzaine de jours à l'air libre et à l'ombre avant d'être finement broyées en poudre dans un broyeur électrique (SEB).



Figure 20. Lieux de récoltes des deux plantes

1.3. Extractions

Les méthodes d'extractions utilisées ont été adaptées à partir des données de Beloued, (1998) et Quejq et *al.*, (2011) pour l'extraction à l'eau, et à partir des travaux de Gilani et *al.* (2007) et Riehemann et *al.*, (1999) pour l'extraction hydro-alcoolique (éthanol/eau). Le schéma général d'extraction est illustré dans la figure suivante (figure 21).

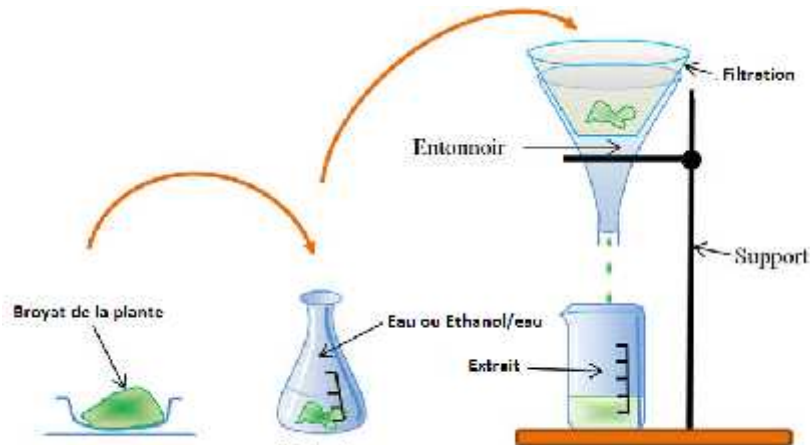


Figure 21. Schéma général d'extraction

a. Extraction à l'eau

Soixante (60) grammes du broyat de chaque plante sont mis à macérer dans 1L d'eau bouillante pendant 20min. Ensuite, ces extraits aqueux sont filtrés et sont conservés dans le frigo pour des utilisations ultérieures (figure 21).

b. Extraction hydro-alcoolique

Les extraits organiques de la bourrache et de l'ortie ont été obtenus par le mélange éthanol/eau 80/20 (v/v) par macération à froid durant 24h. Il s'en suit une filtration et une évaporation sous vide à 60°C pour l'éthanol (figure 21).

c. Calculs des rendements d'extraction:

Les rendements d'extraction sont calculés selon la formule : $R (\%) = 100 M_{\text{ext}}/M_{\text{éch}}$

où:

R est le rendement en %;

M_{ext} est la masse de l'extrait en mg (après l'évaporation du solvant)

et $M_{\text{éch}}$ est la masse sèche de la plante en mg.

1.4. Dosages colorimétriques des composés phénoliques

1.4.1. Dosage des phénols totaux

La concentration en phénols totaux des extraits, a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu (Bouaziz et sayadi, 2005). Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite possède un maximum d'absorption compris entre 725 et 750 nm.

Protocole expérimental

Cinquante (50) μ l de l'extrait sont ajoutés à 250 μ l du réactif Folin-Ciocalteu et 500 μ l de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (20%). Après agitation, au vortex, le volume est ajusté à 5 ml avec de l'eau distillée. Le mélange est alors incubé pendant 30 minutes à température ambiante, puis la densité optique (DO) est mesurée à $\lambda=727$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre (PG instruments T60 UV-visible), utilisé pour tous les dosages. L'eau distillée est utilisée comme blanc pour ajuster le zéro. Le contenu en phénols totaux a été déterminé à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($Y=0,0117x$) (figure 22). Les phénols totaux sont exprimés en mg par gramme d'extrait en équivalent d'acide gallique (voire annexe 3).

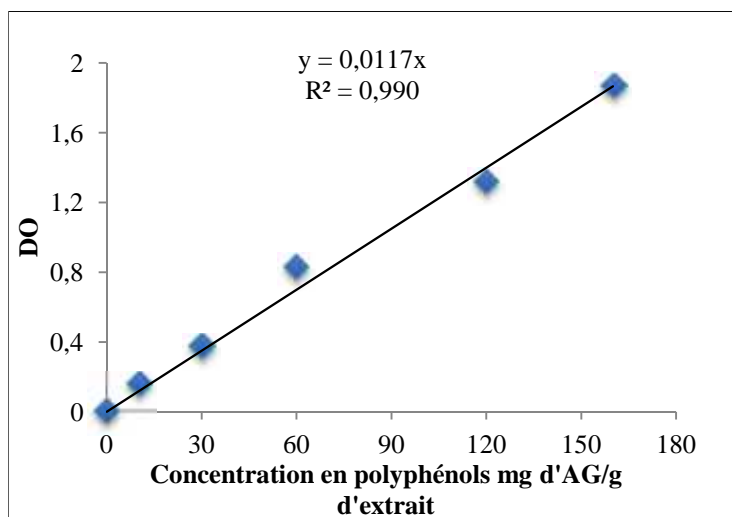


Figure 22. Courbe de variation de la densité optique (DO) à $\lambda=727$ nm en fonction de la concentration d'acide gallique (AG)

1.4.2. Dosage des ortho-diphénols

Les ortho-diphénols ont été déterminés selon la méthode décrite par Ollivier et *al.*, (2004) où les ortho-diphénols forment des complexes colorés avec les ions molybdates.

Protocole expérimental

Deux 02 ml de l'extrait de chaque plante sont ajoutés à 0,5 ml d'une solution de molybdate de sodium déshydraté à 5%. Le mélange est agité vigoureusement et après 15 minutes, l'absorbance des solutions phénoliques est mesurée à 370 nm.

Le contenu en ortho-diphénols a été déterminé à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide caféique ($y = 0,0057x$, $R^2 = 0,9927$) (figure 23). Les ortho-diphénols sont exprimés en mg par g d'extrait sec en équivalent d'acide caféique (annexe 3).

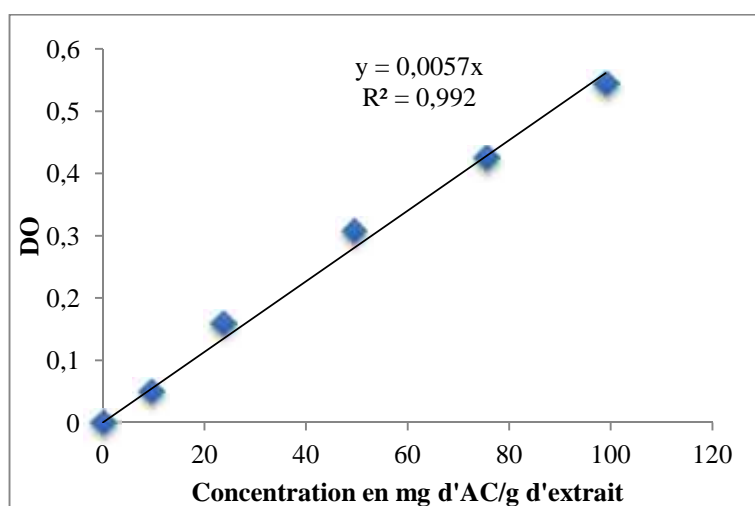


Figure 23. Courbe de variation de la densité optique (DO) à $\lambda=370$ nm en fonction de la concentration de l'acide caféique (AC)

1.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishen *et al.*, (1999) avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

Protocole expérimental

A 1ml de l'échantillon dilué dans le méthanol (500 g/l), on ajoute 4 ml d'eau distillée. Au temps zéro, 300 µl de Nitrate de Sodium (NaNO_2) (50%) sont ajoutés dans un tube à essai puis après cinq minutes, on ajoute 300 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (10%). A la sixième minute, on ajoute 2 ml de soude (NaOH) (1M) au milieu réactionnel puis ce dernier a été ajusté jusqu'à 10 ml. La densité optique (DO) est mesurée à $\lambda=510$ nm et le blanc constitué d'eau distillée. La concentration est calculée à partir de l'équation de la courbe étalon de la quercétine ($y=0,0089x$, $R^2=0,9973$) (figure 24 ; annexe 3).

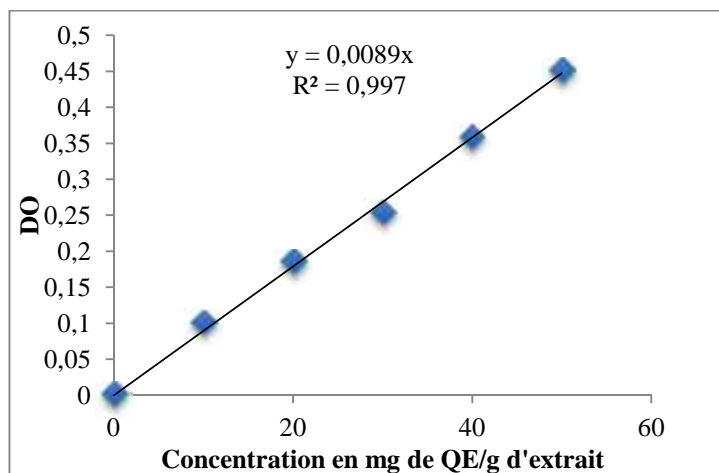


Figure 24. Courbe de variation de la densité optique (DO) à $\lambda=510$ nm en fonction de la concentration de la quercétine (QE)

1.4.4. Dosage des flavanols

La quantification des flavanols a été effectuée par la méthode de Yermakov et *al.*, (1987). Ces substances, lorsqu'elles sont additionnées d'un ion métallique, sont caractérisées par la formation d'un complexe flavanol-Métal et donc l'apparition d'un spectre d'absorption nouveau à 440 nm. L'intensité finale de la bande d'absorption du complexe à 440 nm croît en fonction de la concentration de l'espèce métallique et a une tendance nette à la saturation.

Protocole expérimental

Un (1) ml d' AlCl_3 (20%) a été ajouté à 1 ml de l'extrait diluée suivi par 3 ml d'acétate de sodium (50 mg/ml). L'absorbance est lue après 2,5 heures à $\lambda=440\text{nm}$. Le dosage des flavanols a été calculé à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la rutine ($y=0,085x$, $R^2=1$) (figure 25). Les Flavanols sont exprimés en mg par g d'extrait sec en équivalent rutine (annexe 3).

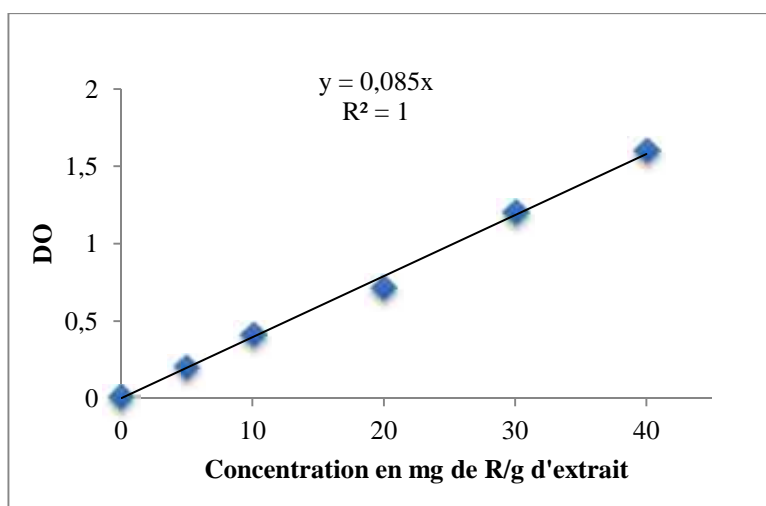


Figure 25. Courbe d'étalonnage de la rutine (R) pour le dosage des flavanols totaux

1.4.5. Dosage des tanins

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (Price et *al.*, 1978). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré (rouge) mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère.

Protocole expérimental

Cinquante (50) µl de l'extrait brut est ajouté à 3 ml de la solution vanilline/méthanol (4%) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 1,5 ml de l'acide chlorhydrique concentré (Hcl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé à réagir à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance est ensuite mesurée à 500 nm.

Les tanins sont exprimés en mg par g d'extrait sec en équivalent de catéchine (figure 26 ; annexe 3).

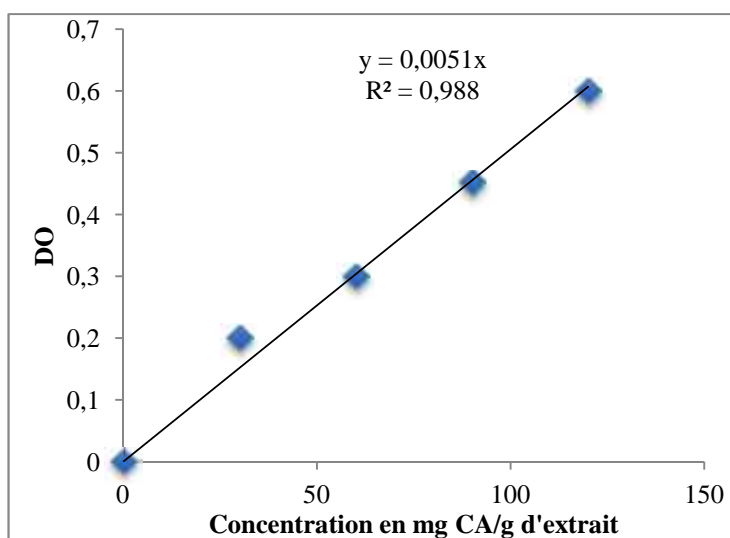


Figure 26. Courbe d'étalonnage de la catéchine (CA) pour le dosage des tanins

1.4.6. Dosage des anthocyanes

Les anthocyanes subissent des transformations structurelles réversibles avec le changement de pH, manifestées par des spectres d'absorption différents. La forme colorée prédomine à pH 1,0 et la forme incolore à pH 4,5. La méthode du différentiel de pH est basée sur cette réaction, et permet une mesure rapide et précise des anthocyanes totales, même en présence de pigments polymérisés dégradés et d'autres composés interférents (Lee *et al.*, 2005).

Protocole expérimental

Pour le dosage de nos échantillons, on prépare deux solutions, l'une à pH = 1 à l'aide d'un tampon de chlorure de potassium (0,03 M) et la seconde à un pH = 4,5 en utilisant un tampon d'acétate de sodium (0,4 M). Les solutions ont été ajustées jusqu'à un litre d'eau.

Quatre (04) ml de chaque solution tampon est mélangé avec 1ml de chaque échantillon. Les solutions sont incubées pendant 30min à l'obscurité puis l'absorbance est lue à 520nm et 700nm par rapport à l'eau distillée, utilisé comme blanc.

La concentration des anthocyanes (mg/l) a été calculée selon la formule suivante et exprimée en équivalent de Cyanidin-3-Glucoside (Annexe 3):

$$\frac{\mathbf{A \times MM \times FD \times 1000}}{\mathbf{x \ d}}$$

A est l'absorbance = $(A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{\text{pH}=1} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{\text{pH}=4,5}$

MM est le poids moléculaire (g/mol) = 449,2 g/mol pour le cyanidin 3-glucoside

FD est le facteur de dilution (FD=100)

est le coefficient d'extinction (L/mol/cm) = 26900 pour le cyanidin 3-glucoside

d=1cm (épaisseur de la cuve).

1.5. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante des extraits a été étudiée par trois méthodes différentes en se référant à l'activité de deux antioxydants : l'acide ascorbique (ou vitamine C) et le Butylated HydroxyToluene (BHT) (Annexe 1 et 4).

1.5.1. Etude de l'activité antioxydante : Méthode DPPH

Le test utilisé pour mesurer le pouvoir anti-radicalaire d'un échantillon est celui décrit par Bouaziz et Sayadi (2005). Ce test a l'avantage d'éviter l'oxydation du substrat sur lequel nous voulons tester l'efficacité d'un antioxydant en choisissant de réduire un radical stable. C'est le cas du 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Dans ce test le substrat d'oxydation est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante se transforme en sa forme réduite, le DPPH-H (figure 27), avec la perte de son absorbance caractéristique à 517 nm.

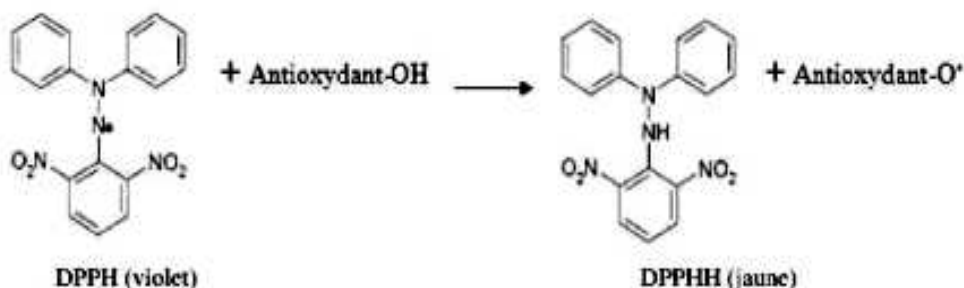


Figure 27. Réaction de piégeage du radical DPPH par le phénol

(Congo, 2012).

On calcule ainsi, la quantité d'antioxydant nécessaire pour faire disparaître 50% du DPPH. Ce dernier possède une coloration violette et absorbe à 517 nm. Quand il réagit avec un antioxydant ou un autre radical, son absorbance et sa couleur typique disparaissent. Le phénomène peut être suivi par spectrophotométrie visible.

Protocole expérimental

Deux (02) ml de la solution méthanolique de l'échantillon à tester à différentes concentrations (10, 20, 30 50, 100, 200 et 500 µg/ml) sont mélangés à 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (60 mg/l). Après agitation, les solutions sont mises à l'obscurité pendant 30 mn. Puis, les densités optiques sont mesurées à 520 nm contre l'éthanol (blanc). Pour chaque concentration en extrait, le pourcentage d'absorption est calculé :

$$\%DO = \frac{DO_{DPPH} - DO_{\text{échantillon}}}{DO_{DPPH}} \times 100$$

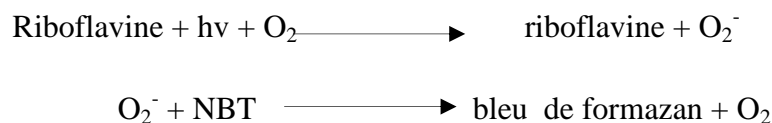
Détermination de l'IC₅₀

L'IC₅₀ représente la quantité de substance d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la quantité de DPPH' initialement présente. Elle est exprimée en µg/ml d'extrait végétal. L'IC₅₀ (%) est obtenue par l'équation de la droite moyenne du pourcentage de DPPH résiduel en fonction de la concentration en antioxydant. La plus forte activité anti-radicalaire correspond à la fraction qui possède l'IC₅₀ la plus faible.

La courbe % DO échantillon = f (C échantillon) est tracée et la projection du point correspondant à 50 % de la DO échantillon sur l'axe des abscisses permet de calculer l'IC₅₀ en µg/ml d'extrait.

1.5.2. Etude de l'activité antioxydante par la méthode NBT

Ce test consiste à détecter l'oxydation par réaction avec l'anion superoxyde. Ainsi, la riboflavine agit comme transporteur d'électrons et participe comme cofacteur aux réactions d'oxydoréduction en présence de l'oxygène moléculaire. Les flavines réduites sont des groupements donateurs d'électrons à l'oxygène moléculaire qui se transforme en radical superoxyde. La molécule de nitrobleu tetrazolium NBT réagit avec l'anion superoxyde pour donner le NBT oxydé (tétrazoïnyle) qui se transforme en formazan de couleur pourpre et insoluble dans l'eau (Yagi et *al.*, 2002), selon les réactions suivantes :



Protocole expérimental

Cent (100) µl de la solution à analyser et des témoins positifs ont été mis en présence de tampon phosphate de potassium, d'EDTA, de NBT et de riboflavine puis exposés pendant 10min à une lumière intense. L'absorbance a été mesurée contre un blanc (zéro au spectrophotomètre) qui renferme tous les composants de l'essai à l'exception du NBT.

L'activité antioxydante a été déterminée par la diminution de la coloration détectée par spectrophotométrie à 560 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la formation du radical O_2^- a été déterminé selon la formule suivante :

$$PI (\%) = \left(1 - \frac{DO \text{ essai}}{DO 100\%}\right) \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition.

DO essai : DO en présence de l'extrait ou témoin.

DO témoin : DO en présence de l'extrait ou témoin.

1.5.3. Etude de l'activité antioxydante totale

Les activités antioxydantes totales, de nos extraits ainsi que des témoins positifs, sont déterminées par la méthode utilisant le phosphomolybdène, décrite par Prieto et *al.*, (1999). Cette technique est basée sur la réduction ou le transfert d'électrons (e^-), par l'extrait antioxydant, du molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdène Mo (V) sous la forme MoO_2^+ , avec formation du complexe phosphate/Mo (V), de couleur verdâtre à pH acide.

Protocole expérimental

Cent (100) μ l de chaque échantillon sont mélangés à 1ml de la solution de réaction composée par le H_2SO_4 (0,6 M), le tampon phosphate (28 mM) et le $MoNH_4$ (4 mM). Les tubes sont ensuite incubés durant 90 mn à 95°C. Après incubation et refroidissement des échantillons à température ambiante, l'absorbance est déterminée à 695 nm contre un blanc. L'activité antioxydante totale est exprimée en acide ascorbique équivalent/mg d'extrait et en BHT équivalent/mg d'extrait.

1.6. Séparation et purification par chromatographie liquide à Haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

La spectrophotométrie de masse (en anglais, *mass spectrometry* ou MS) a pour but d'exciter des molécules chargées (ions) afin d'accroître leur énergie interne et ainsi de les faire fragmenter. Ces ions stables sont séparés en phase gazeuse et détectés puis identifiés par mesure de leur masse et caractérisation de leur structure chimique. La figure 28 montre un schéma récapitulatif du principe de son fonctionnement.

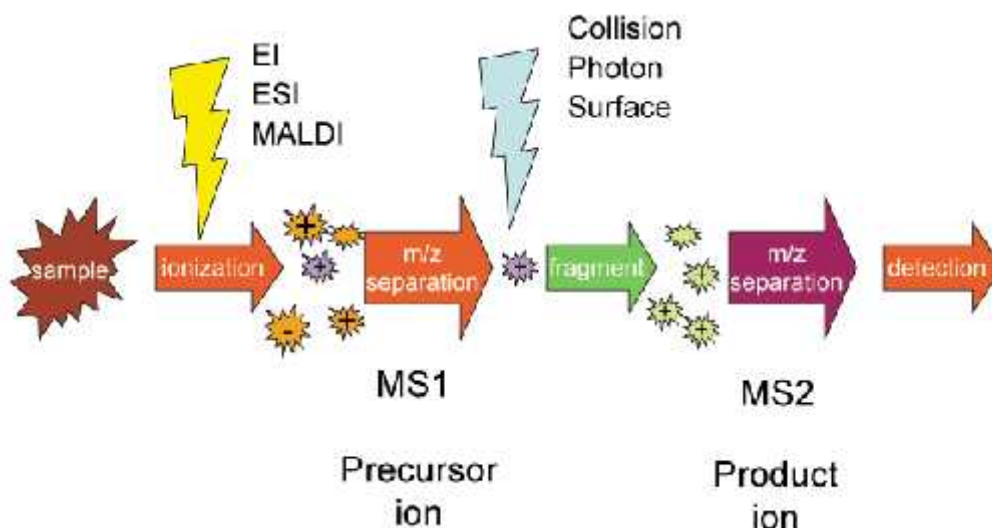


Figure 28. Schéma du principe de fonctionnement de la ms/ms

Protocole expérimental

Les analyses LC-MS/MS sont réalisées à l'aide d'un système Agilent 1100 LC constitué par une pompe binaire, un dégazeur, une colonne de chauffage et un injecteur automatique. La colonne est couplée avec un spectromètre de masse de type Agilent MSD Ion Trap XCT équipé d'une source ESI. Une colonne de type Zrbax 300 A° Exend-18 (2,1 * 150 mm) est utilisée pour la chromatographie.

Les paramètres suivants sont utilisés pour les expériences de MS:

- le voltage capillaire est réglé à 3,5 KV,
- la température est de 350°C,
- la pression du nébuliseur est de 40 psi,
- le débit du gaz est de 10 L/min.
- Le temps maximal d'accumulation est de 50ms,
- la vitesse de balayage est de 26,000 m/z s⁻¹
- et le temps de fragmentation est de 30 ms.

Le gradient d'élution retenu est formé de deux mélanges :

Solvant A: composé de 0,1% d'acide formique dans l'eau.

Solvant B: composé de 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile.

La colonne est parcourue pendant une minute par 95% d'un solvant A et 5% d'un solvant B suivie d'un gradient durant 11 min de 5% à 100% du solvant B, puis 100% du solvant B pendant 4min, et finalement, l'élution est terminée avec un gradient linéaire passant de 100% à 5% du solvant B durant 2 min. Le débit est de 200 µl/min et le volume d'injection est de 5 µl.

2. Etude des activités biologiques *in vivo*

2.1. Animaux et conditions d'élevage

Nous avons utilisé 42 rats blancs mâles de la souche Wistar, provenant de l'institut pasteur d'Algérie. Les expériences effectuées sur ces animaux ont été réalisées conformément aux directives d'éthique des expérimentations animales (déclaration de Bâle, 2010).

Ces rongeurs, d'un poids vif moyen de 140 g, ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie, à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ et une photopériode naturelle. Ils sont élevés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée un jour sur deux jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ces animaux ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré provenant de l'ONAB de Bejaïa et dont la composition est détaillée dans l'Annexe 5.

2.2. Protocole expérimental

2.2.1. Formation des lots et traitements des rats

Les rats ont été divisés équitablement en 6 lots de 7 rats chacun (Figure 29). Ils ont été sensibilisés à l'ovalbumine et/ou traités avec les deux plantes conformément à l'étude de Beloued (1998), voir l'annexe 6, pour plus de détails concernant le calcul de la dose.

En bref, les six lots sont constitués de :

- Le lot 1 :** rats témoins (T), subissant le même traitement que les autres lots mais recevant uniquement de l'eau physiologique.
- Le lot 2 :** rats sensibilisés à l'ovalbumine (OVA), développant un asthme expérimental.
- Le lot 3 :** rats traités par voie orale avec 1,37 g d'extrait de bourrache/Kg/jour (BO).
- Le lot 4 :** rats sensibilisés à l'OVA et traités avec l'extrait de bourrache à 1,37g d'extrait de bourrache/Kg/jour (O/BO)
- Le lot 5 :** rats traités par voie orale avec 1,5 g d'extrait d'ortie/Kg/jour (UD)
- Le lot 6 :** rats sensibilisés à l'OVA et traités avec l'extrait d'ortie à 1,5g d'extrait d'ortie/Kg/jour (O/UD).

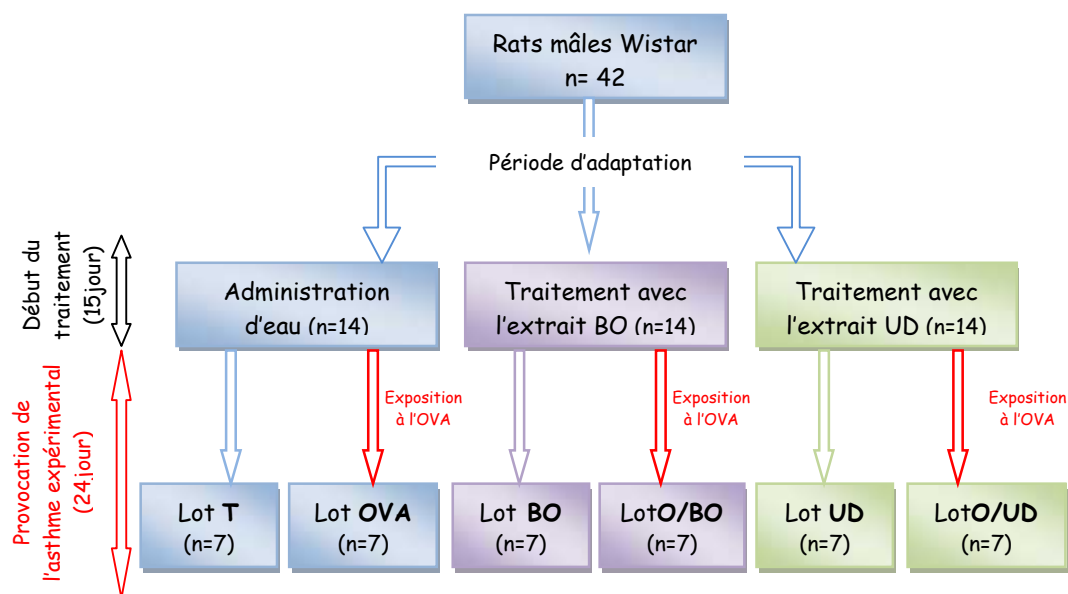


Figure 29. Compartimentation des rats en six lots traités différemment

2.2.2. Sensibilisation à l'ovalbumine

Les lots OVA, O/BO et O/UD ont été sensibilisés à l'ovalbumine (grade II, Réf. A5253-250G, Sigma Aldrich), selon une méthode provoquant une inflammation aigüe avec un phénotype d'asthme allergique, validée dans la littérature (Moura et *al.*, 2005 ; Yang et *al.*, 2011).

Dans ce modèle, la sensibilisation est effectuée à l'aide de petites quantités d'ovalbumine (10 mg/ml) combinées à un adjuvant d'hydroxyde d'aluminium ($Al(OH_3)$) (Alun, Sigma Aldrich) dissout à raison de 1mg/ml dans une solution saline à 0,9%. La sensibilisation a lieu par voie intra-péritonéale, au premier jour (J_0) et répétée 13 jours plus tard (J_{13}) selon le protocole schématisé dans la figure 30.

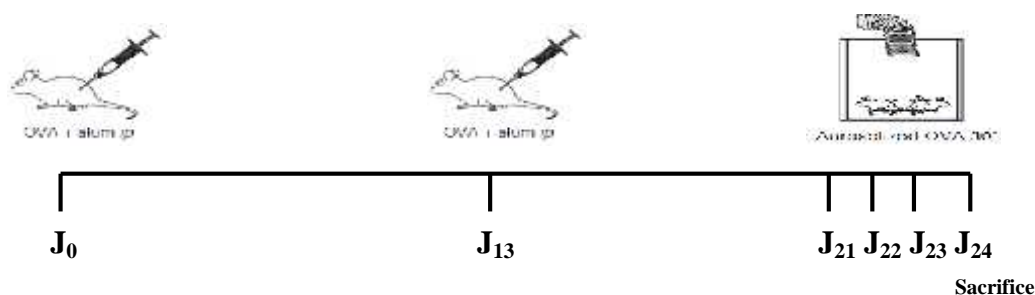


Figure 30. Protocole de sensibilisation

2.2.3. Provocation des animaux par aérosol

La réaction anaphylactique a été induite par une réexposition au même allergène par inhalation intra-nasale d'ovalbumine diluée dans une solution saline à 0,9% et ce à une concentration de 5 mg/ml (Moura et *al.*, 2005). Ainsi, comme le montre la figure 31, aux jours 21, 22 et 23, les animaux des 3 lots (OVA, O/BO, O/UD) ont été placés dans une chambre en

plexiglas qui dispose d'une ouverture permettant le libre passage du nébulisât via un nébuliseur à compression (OMRON, NE-C29-E) fonctionnant à un débit de 0,4 ml/min pendant une durée de 30 minutes.

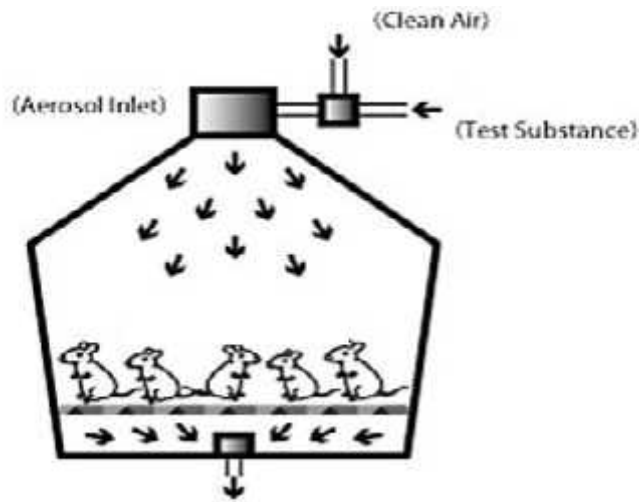


Figure 31. Schéma montrant la provocation des rats par l'aérosol

2.3. Sacrifice et prélèvements:

2.3.1. Prélèvement sanguin :

Après 39 jours de traitement les rats appartenant aux 6 groupes sont sacrifiés (par décapitation). Le sang de chaque rat est immédiatement recueilli dans deux types de tubes polyéthylènes étiquetés (tube avec anticoagulant EDTA et tube sec). Le tube sans anticoagulant est alors centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes. Les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse. Alors que les tubes à EDTA sont immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire d'analyse (Laboratoire d'Analyse Médicale du Dr. Kaci , Annaba) pour déterminer la formule de numération sanguine (FNS).

2.3.2. Prélèvement du liquide broncho-alvéolaire

Immédiatement après récupération du sang, le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est effectuée. La technique utilisée consiste à ouvrir la cage thoracique des animaux et y insérer un cathéter dans la trachée. Des seringues remplies de solution saline à 0,9% sont reliées au cathéter. La solution saline est ensuite injectée dans le poumon, puis réaspirée dans la seringue (Dorion, 2005).

Au bout de 3 lavages de 2 ml chacun, le liquide du LBA recueilli, est centrifugé à 1500 tr/min pendant 10 minutes. Le culot cellulaire a été vortexé et re-suspendu dans 500 μl de solution saline et destiné au comptage leucocytaire. Le surnageant pour sa part a servi pour le dosage de l'interleukine-4.

2.3.3. Prélèvement des organes :

Les animaux sacrifiés ont été éventrés pour le prélèvement de certains organes :

- Le foie de chaque rat a été pesé puis stocké au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant.
- Les poumons ont été stockés selon deux méthodes: la moitié au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant, et l'autre moitié fixée dans du formaldéhyde à 10% afin de réaliser des coupes histologiques.

2.4. Dosage des protéines :

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ($-NH_2$) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

Pour cela, 0,1 ml d'homogénat ou du standard (BSA) est mélangé à 5 ml du bleu de Coomassie. Après 5 minutes d'incubation, la lecture des densités optiques contre le blanc s'effectue à 595 nm.

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (figure 32).

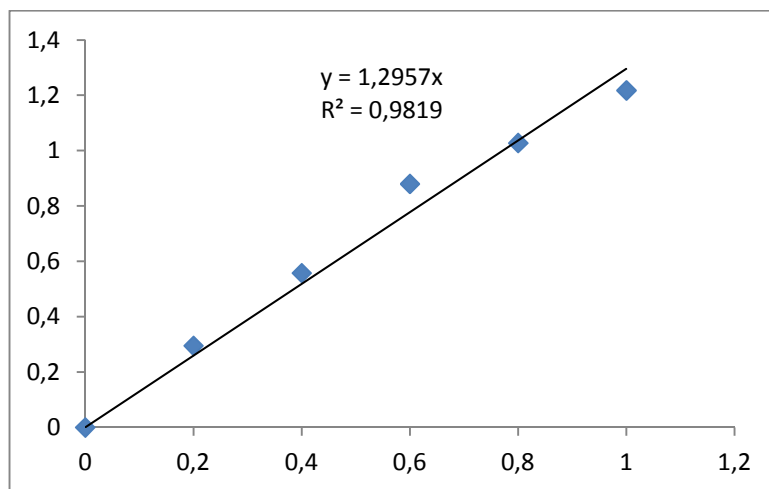


Figure 32. La gamme d'étalonnage du BSA (mg/ml)

2.5. Numération des leucocytes au niveau du liquide du LBA

La suspension cellulaire issue du liquide du LBA est étalée sur des lames de microscope et séchée à l'air libre. Ces lames sont colorées avec le GIEMSA. Après coloration, un examen

au microscope optique (Optica) est effectué pour le comptage des cellules. Le nombre d'éosinophiles et de lymphocytes seront exprimés en pourcentage par rapport aux leucocytes totaux.

2.6. Dosage ELISA de l'interleukine-4

Le dosage de l'interleukine-4 (IL-4) dans le sérum et le liquide du LBA des rats est réalisé grâce au kit Invitrogen Rat Interleukin-4 (Rt IL-4) qui utilise la méthode ELISA sandwich (REF : KRC0041 ; Lot : 1260054A1).

La première étape de la technique ELISA est déjà effectuée lors de l'achat du Kit. Elle est nommée "coating", durant laquelle, l'anticorps de capture spécifique à l'IL-4 de rat avait été fixé au fond des cupules (figure 33).

Lors de l'étape suivante, l'échantillon (contenant éventuellement l'antigène IL-4 à doser) ou le standard (contenant l'IL-4 à des doses connues) sont déposés dans les puits. Un second anticorps couplé à la biotine est alors ajouté. Durant la première incubation, il y a formation du sandwich car la molécule d'IL-4 se fixe d'une part sur l'anticorps immobilisé aux parois des puits et d'autre part sur l'anticorps biotinylé.

Après l'étape du lavage, l'enzyme, la peroxydase liée à la streptavidine, est ajoutée permettant de transformer dans la dernière étape le substrat Tetramethylbenzidine (TMB) en produit coloré en bleu.

L'ajout de la solution d'arrêt provoque le virage de la couleur au jaune. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration de l'IL-4 qui est déterminée par comparaison à la gamme-étalon du standard.

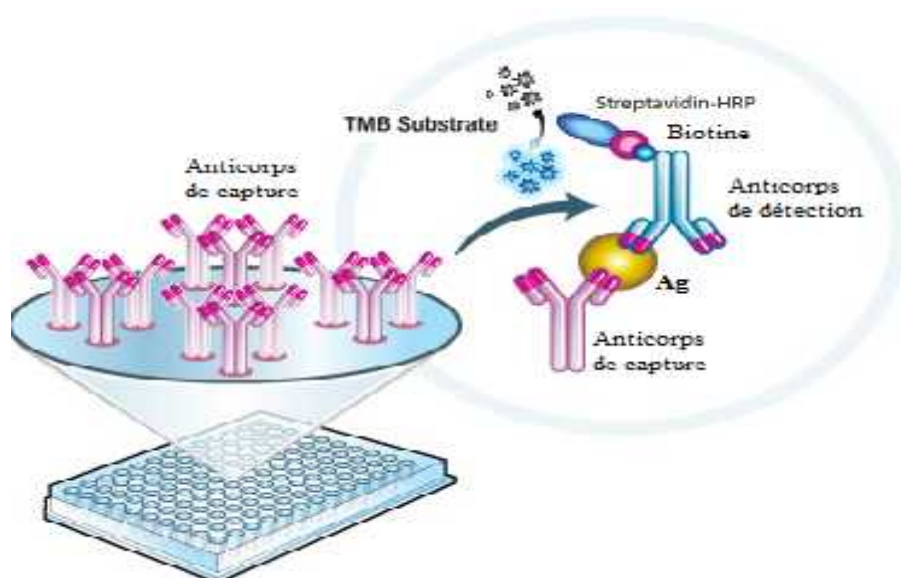


Figure 33. Principe de la technique ELISA Sandwich

Protocole expérimental :

Les puits de la microplaque sont d'abord répartis entre les contrôles, les standards, les échantillons de sérum et du liquide du LBA. Le protocole expérimental a été résumé dans le tableau 2.

Tableau II. Protocole expérimental du Test ELISA

Déposer dans chaque puits	Contrôles 50µl	Standards 50µl	Echantillons	
			Sérum 100µl	LBA 50µl
Tampon	50 µl	50 µl	-	50 µl
anti-IL-4 biotinylée	-	50 µl	50 µl	50 µl
Incubation 2h				
Aspirer et Laver avec la solution de lavage (4 fois)				
Streptavidin-HRP	-	100 µl	100 µl	100 µl
Incubation 30 min				
Aspirer et Laver avec la solution de lavage (4 fois)				
Chromogène TMB	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incubation 30 min à l'obscurité				
Solution d'arrêt	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Lecture à l'aide d'un lecteur de plaque à 450nm				

2.7. Etude histologique

Elle a été réalisée à l'hôpital Ibn Rochd d'Annaba au Service d'anatomie pathologique. La technique utilisée est celle décrite par Hould (1984). Elle comporte les étapes suivantes :

a. Fixation

La fixation des fragments de poumon est faite dans le Bouin alcoolique. Ils sont mis dans des cassettes spéciales à parois retournées afin de permettre le passage des liquides.

b. Enrobage et obtention des blocs

La réalisation de coupes fines et régulières nécessite l'inclusion des échantillons dans un bloc de paraffine, comme suit :

- **Déshydratation** : Tout d'abord, les échantillons sont déshydratés dans un appareil qui permet leur passage automatique et progressif dans des bains d'alcools : 1 bain d'éthanol 70% durant 24h, deux bains d'éthanol à 95% (4 à 5h chacun) et deux bains d'éthanol absolu (4 à 5h chacun).
- **Eclaircissement** : Ensuite, l'éthanol est remplacé par un solvant miscible à la paraffine. Il s'agit du Toluène qui élimine l'éthanol et clarifie les tissus (deux bains de 45 minutes chacun).

- **Inclusion** : En fin, les tissus sont maintenus et imbibés dans des bains de paraffine liquide (portée à 56/58°C). Finalement, le tissu imprégné est enrobé par inclusion dans un bloc de paraffine fondue. Ce dernier se solidifie grâce à un dispositif réfrigéré permettant sa microtomie.

c. Confection de coupes

La réalisation des coupes minces de quelques microns (5µm en moyenne) est possible grâce à un microtome (Leica RM2235). Ces dernières sont étalées sur des lames porte - objet, dépliées et fixées par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

d. Coloration

La technique à l'hématoxyline - Eosine (Hématéine - Eosine) a été utilisée en suivant les étapes suivantes :

- Le déparaffinage et l'hydratation des lames sont effectués par l'eau du robinet, suivie par un rinçage à l'eau distillée.
- L'immersion dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- La différenciation des coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- Le bleuissement dans un bain d'eau ammoniacale.
- L'immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique (Optica) et photographiées à l'aide d'un appareil photo (Samsung).

2.8. Exploration des paramètres du stress oxydant

2.8.1. Dosage du malondialdéhyde

La détection du malondialdéhyde (MDA) issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA), constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipoperoxydation *in vitro*. Ce dosage est réalisé selon la méthode d'Esterbauer et *al.*, (1992).

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation du MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose). Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm (Figure 34).

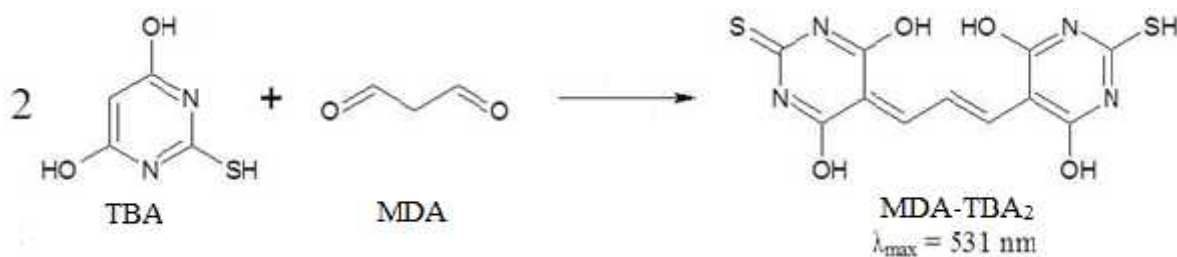


Figure 34. Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique

Protocole expérimental :

375 μl de l'homogénat (surnageant) sont prélevés et additionnés de 150 μl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,4) à laquelle sont ajoutés 375 μl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%). Après agitation, le mélange est centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 min. 400 μl du surnageant sont alors prélevés et additionnés de 80 μl du HCl 0,6 M ainsi que de 320 μl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM). Le mélange est incubé au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

La densité optique a été enregistrée à $\lambda = 530 \text{ nm}$. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés. La concentration du MDA est ainsi calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L) :

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO \cdot 10^6}{L \cdot Fd}$$

C : Concentration en nmoles/mg de protéines.

DO : Densité optique lue à 530 nm.

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L : Longueur du trajet optique = 0,779 cm.

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).

Fd : Facteur de dilution : Fd = 0,2083.

2.8.2. Dosage du glutathion:

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de Weekbeker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB)

par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela, on réalise une déprotéinisation afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

Protocole expérimental :

0,8 ml de l'homogénat sont prélevés et additionnés de 0,2 ml de la solution d'acide salicylique (0,25%). Après agitation, le mélange est incubé pendant 15 minutes dans un bain de glace, puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 5 min.

Ensuite, 0,5 ml du surnageant sont prélevés et additionnés d'un (01) ml du tampon Tris, pH 9,6. Puis, 0,025 ml de l'acide 5,5- dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0,01 M sont ajoutés au mélange précédent. Les densités optiques sont lues à 412 nm contre le blanc réactif et ce après une incubation de 5 min à une température ambiante.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO \cdot 1 \cdot 1,525}{13100 \cdot 0,8 \cdot 0,5 \cdot \text{mg protéines}}$$

DO : Densité optique.

1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8ml homogénat + 0,2 ml de l'acide salicylique).

1,525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5 ml surnageant+1 ml Tris + 0,025 ml DTNB).

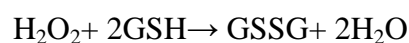
13100 : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.

0,8 : Volume de l'homogénat.

0,5 : Volume du surnageant.

2.8.3. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) :

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH). Ce dernier est transformé en glutathion dissulfide (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Protocole expérimental :

0,2 ml de l'homogénat (surnageant) sont prélevés et additionnés de 0,4 ml de GSH (0,1 mM). Puis, 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y sont ajoutés. Le mélange réactionnel est incubé au bain marie à 25°C, pendant 5 min. Ensuite, 0,2 ml de H₂O₂ (1,3 mM) y sont ajoutés pour initier la réaction.

Après une incubation de 10 minutes, 1 ml de TCA (1%) sont rajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est en fin mis dans de la glace pendant 30 minutes et centrifugé durant 10 minutes à 3000 tours /minutes. 0,48 ml du surnageant sont alors prélevés et additionnés de 2,2 ml de la solution tampon TBS à laquelle on rajoute 0,32 ml de DTNB (1 mM). Le mélange est agité et après 5 minutes les densités optiques sont lues à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH/mg protéine}) = \frac{[(\text{DO}_{\text{échantillon}} \times \text{DO}_{\text{étalon}}) \times 0,04 / \text{DO}_{\text{étalon}}] \times 5}{\text{Concentration de protéines en mg}}$$

DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.

DO étalon : Densité optique de l'étalon.

0,04 : Concentration de substrat (GSH).

2.8.4. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) :

La méthode de dosage de l'activité SOD (tableau 3) par le test NBT est une méthode de photoréduction de complexe riboflavine/méthionine qui génère des anions superoxydes. L'oxydation du NBT par l'anion superoxyde O₂⁻ est utilisée comme base de détection de la présence de SOD. Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre. La présence de SOD inhibe l'oxydation du NBT (Beyer et Fridovich, 1987).

Protocole expérimental

Pour le milieu réactionnel, le protocole expérimental suivant a été suivi :

Tableau III. Composition du milieu réactionnel pour le dosage de la SOD

Prélever dans les cuvettes	Cuve de référence (zéro du spectrophotomètre)	Cuve illuminée		Concentration du milieu réactionnel
		Totale (B)	Echantillon (E)	
EDTA-Met	1000µl	1000µl	1000µl	EDTA (0,1mM) Met (13mM)
Tampon phosphate	892,2µl	892,2µl	892,2µl	
Echantillon	Xµl	_____	Xµl	_____
Tampon phosphate	1000-Xµl	1000µl	1000µl	50mM
NBT	85,2µl	85,2µl	85,2µl	75µM
Riboflavine	22,6µl	22,6µl	22,6µl	2µM

Calcul de l'activité SOD

L'activité SOD = % d'inhibition / mg de protéine

$$Y = \left(\left[\frac{(\text{DO}_B - \text{DO}_E)}{\text{DO}_B} \times 100 \right] \times \frac{20}{\text{Concentration protéine mg/ml}} \right) \times \text{Facteur de dilution}$$

Une unité SOD correspond à la quantité de protéines qui induit 50% d'inhibition.

Y —————> 1mg de protéine

50 —————> 50/Y mg de protéine

Y c'est le pourcentage d'inhibition / mg de protéine

50/Y mg de protéine —————> correspond à une unité SOD

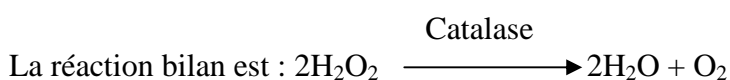
1mg de protéine —————> correspond à : $\frac{1 \times 1}{50/Y} = Y/50$ Unité SOD/mg de protéine

$$\text{Activité spécifique SOD} = Y/50 \text{ unité SOD / mg de protéine}$$

2.8.5. Dosage de l'activité catalase (CAT)

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes :



L'activité catalase CAT est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en faisant réagir dans 780µl de tampon phosphate (100mM) pendant 1 min à un pH de 7,4, 200µl de H₂O₂ (500mM) sur 20µl de surnageant, à une température d'incubation de 25°C.

Protocole expérimental

Le tableau 4 ci-dessous représente les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase :

Tableau IV. Composition du milieu réactionnel pour le dosage de la CAT

	Essai (µl)	Blanc (µl)
Tampon phosphate (100mM ; pH 7,5)	780	800
H ₂ O ₂ 500mM	200	200
Surnageant (1 à 1,5 mg protéine/ml)	20	0

On note que :

- Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate.
- La quantité du surnageant doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20µl de surnageant dilué.
- L'activité décroît rapidement, il est important de mettre toujours le même temps entre le pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

Calcul de l'activité CAT : L'activité de la catalase peut être calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min/mg de protéine}) = \frac{\text{DO} \times \text{d}}{\text{x } 0,02 \times [] \text{ protéines}}$$

Où:

d : la dilution de l'échantillon au début.

: le coefficient d'extinction de H₂O₂ = 0,043 mM⁻¹ cm⁻¹ = 0,043 µmole cm⁻¹ ml⁻¹

[] protéines : la concentration en protéines du surnageant (mg/ml)

DO : la variation de la densité optique qui est égale à (A_I - A_F) x 4 / 3 par minute, où :
A_I c'est l'absorbance initiale (à 15 secondes) et A_F c'est l'absorbance finale (à 1 minute).

3. Traitement statistique des résultats :

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes \pm l'erreur standard. Ces calculs ont été effectués à l'aide des logiciels MINITAB (Version17) et Microsoft Excel (2007) d'analyse et de traitement statistique des données.

L'évaluation statistique a été effectuée en utilisant le test t de Student. Selon le seuil de signification (p), les différences, comparativement au témoin, sont considérées comme :

- Significatives, lorsque $p \leq 0,05$.
- Hautement significatives, lorsque $p \leq 0,01$.
- Très hautement significatives, lorsque $p \leq 0,001$.

La corrélation est effectuée avec le coefficient de corrélation Pearson, variant entre +1 et -1, où un coefficient égale à +1 montre une corrélation positive parfaite et un coefficient égale à -1 montre une corrélation négative parfaite.

Partie expérimentale : Résultats & discussion

1. La composition chimique & les propriétés antioxydantes des plantes choisies

1.1. Résultats des extractions

Nous avons utilisé du broyat de chaque plante en macération soit avec l'eau bouillante ou bien l'éthanol/eau (80:20). Ces macérations ont permis l'extraction des phyto-composés les plus divers selon le principe "like dissolves like". Ainsi, chaque solvant utilisé a permis de dissoudre les composés de polarité similaire.

Sachant que des périodes d'extraction plus longues auraient endommagées les composés phénoliques, nous avons opté pour des temps de macérations de 20 minutes pour l'extrait aqueux et 24h pour l'extrait éthanolique. Ceci a permis d'obtenir un maximum de composés phénoliques en un temps qui nous a semblé le plus propice au meilleur rendement.

En effet, le rendement des différentes extractions est donné dans le tableau 5. On remarque que le rendement d'extraction des extraits de BO et UD varie entre 4,83% et 45% selon le type d'extraction utilisée. En effet, les extraits aqueux présentent les meilleurs rendements d'extraction avec des valeurs de 40% à 45%. Les pouvoirs d'extraction des extraits à l'éthanol ont les plus faibles rendements d'extractions avec un rendement de 7,26% pour l'extrait éthanolique d'ortie et de 4,83% pour la bourrache.

Tableau V. Rendements des extractions différentielles obtenues pour les deux plantes

Plante	Solvant d'extraction	Etat de l'extrait	Rendement (%)
<i>Borago officinalis</i>	Ethanol 80%	Pâte marron foncé	4,83 ± 0,40
	Eau	Liquide visqueux marron	45 ± 0,21
<i>Urtica dioica</i>	Ethanol 80%	Résine verte	7,26 ± 0,71
	Eau	Liquide visqueux marron	40 ± 0,22

Les valeurs données représentent la moyenne de trois mesures ± SE

1.2. Dosage des composés phénoliques

Les dosages des polyphénols, des ortho-diphénols, des flavonoïdes, des flavanols, des tanins et des anthocyanes totaux sont effectués aussi bien pour les extraits éthanoliques que pour les extraits aqueux de la bourrache et de l'ortie.

1.2.1. Dosage des phénols totaux

Les contenus en phénols totaux des différents extraits de *Borago officinalis* et d'*Urtica dioica* ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les concentrations obtenues en phénols totaux exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de plante sont présentées dans la figure 35. La concentration en polyphénols dans les deux plantes est de deux fois supérieure dans les extraits éthanoliques par rapport aux extraits aqueux. L'extrait éthanol/eau 80/20 (v/v) de *Borago officinalis* enregistre la plus grande concentration en polyphénols ($94,09 \pm 1,72$) suivi de l'extrait à l'éthanol d'ortie ($85,11 \pm 0,35$), de l'extrait aqueux de bourrache ($35,48 \pm 2,70$) et enfin l'extrait aqueux d'ortie ($30,79 \pm 0,96$).

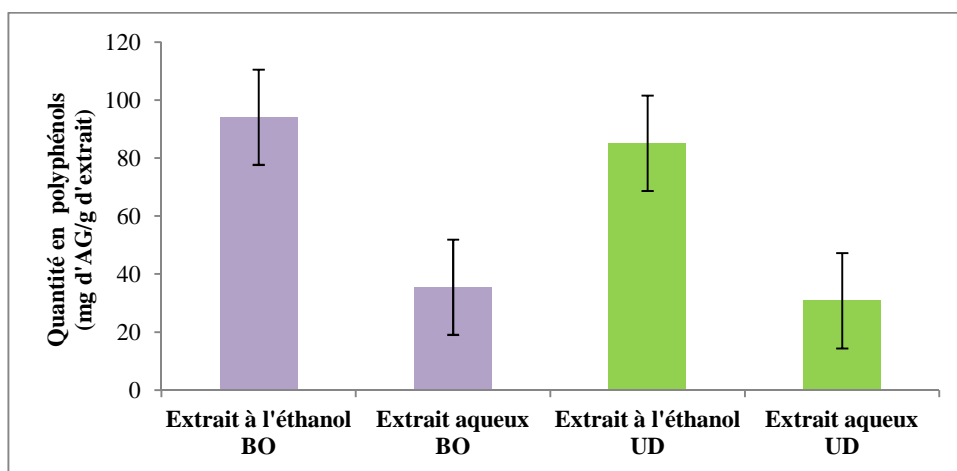


Figure 35. Variations des concentrations de polyphénols totaux dans les extraits de *Borago officinalis* (BO) et *Urtica Dioica* (UD)

1.2.2. Dosage des ortho-diphénols

Les concentrations en ortho-diphénols calculées à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide caféique sont résumées dans la figure 36. De même que pour les polyphénols, les concentrations en ortho-diphénols sont bien supérieures dans les extraits éthanoliques ; où $31,08 \pm 0,73$ mg d'AC/g d'extrait est enregistré pour l'extrait de BO et de $23,37 \pm 0,873$ mg d'AC/g d'extrait pour celui d'UD ; par rapport aux extraits aqueux ; où nous enregistrons des valeurs de $4,97 \pm 0,34$ et de $3,11 \pm 0,30$ mg d'AC/g d'extrait pour les extrait de bourrache et d'ortie, respectivement.

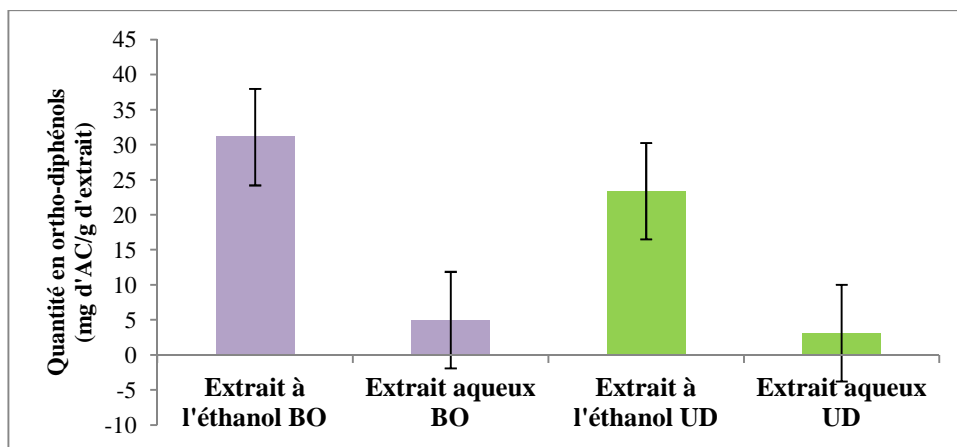


Figure 36. Variations des concentrations des ortho-phénols totaux dans les extraits de *Borago officinalis* (BO) et *Urtica Dioica* (UD)

1.2.3. Dosage des flavonoïdes totaux

Les résultats obtenus suite au dosage des flavonoïdes sont présentés dans la figure 37 et exprimés en mg d'équivalent quercitrine par g d'extrait. Les concentrations en flavonoïdes des extraits éthanoliques des deux plantes ($27,65 \pm 3,93$ pour la bourrache et $39,96 \pm 2,56$ pour l'ortie) sont supérieures à celles des extraits aqueux ($15,79 \pm 2,95$ pour la bourrache et $22,58 \pm 1,02$ pour l'ortie).

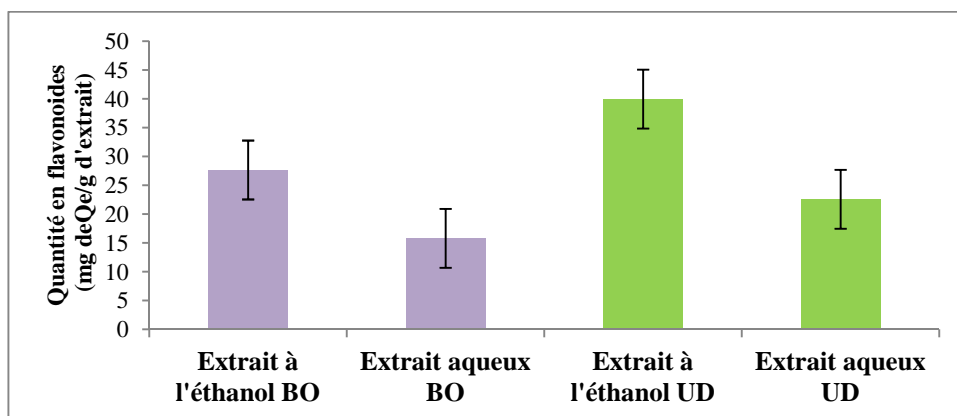


Figure 37. Variations des concentrations de flavonoïdes totaux dans les extraits de *Borago officinalis* (BO) et *Urtica Dioica* (UD)

1.2.4. Dosage des flavanols totaux

Suite au dosage des flavanols, décrit précédemment, nous avons obtenus les résultats résumés dans la figure 38. L'extrait éthanol/eau de BO enregistre la plus grande concentration en flavanols ($11,39 \pm 1,56$ mg de R/g d'extrait) suivi de l'extrait à l'éthanol d'ortie ($10,88 \pm 1,35$ mg de R/g d'extrait), de l'extrait aqueux de bourrache ($9,01 \pm 0,18$ mg de R/g d'extrait) et enfin l'extrait aqueux d'ortie ($6,30 \pm 1,59$ mg de R/g d'extrait).

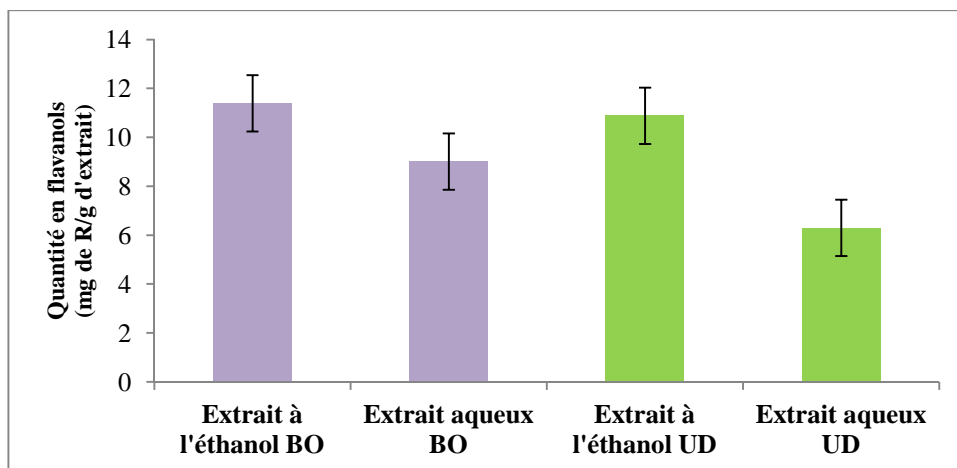


Figure 38. Variations des concentrations de flavanols totaux dans les extraits de *Borago officinalis* (BO) et *Urtica Dioica* (UD)

1.2.5. Dosage des tanins totaux

Les concentrations en tanins sont exprimées en mg en équivalent catéchine par g d'extrait et sont résumées dans la figure 39. Les extraits éthanoliques enregistrent une quantité supérieure de tanins par rapport aux extraits aqueux. La plus grande quantité est enregistrée dans l'extrait à l'éthanol de la bourache avec une valeur de $6,67 \pm 0,69$ et la plus petite dans l'extrait aqueux d'ortie avec une valeur $1,05 \pm 0,34$. L'extrait éthanolique d'ortie et aqueux de bourrache montrent des taux de $6,29 \pm 1,03$ et de $3,14 \pm 0,60$, respectivement.

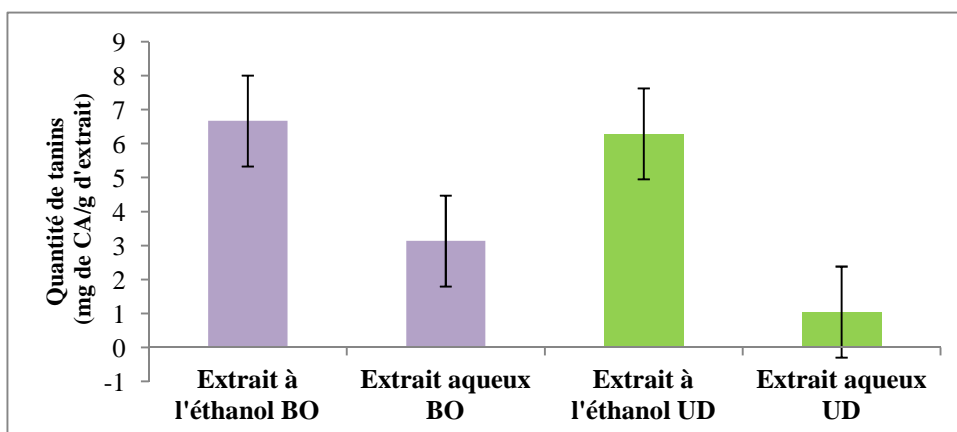


Figure 39. Variations des concentrations de tanins totaux dans les extraits de *Borago officinalis* (BO) et *Urtica Dioica* (UD)

1.2.6. Dosage des anthocyanes

Les concentrations en anthocyanes sont exprimées en mg équivalent de Cyanidin-3-Glucoside par g d'extrait et sont résumées dans la figure 40. Le classement décroissant en concentration d'anthocyanes est comme suit : l'extrait éthanolique d'ortie ($1,72 \pm 1,22$) > l'extrait éthanolique de bourrache ($0,27 \pm 0,09$) > l'extrait aqueux d'ortie ($0,17 \pm 0,03$) > l'extrait aqueux de bourrache ($0,09 \pm 0,01$).

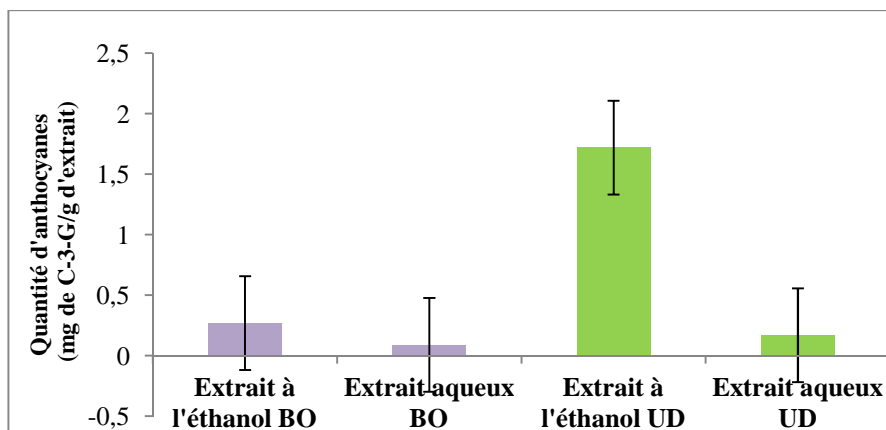


Figure 40. Variations des concentrations d'anthocyanes totaux dans les extraits de *Borago officinalis* (BO) et *Urtica Dioica* (UD)

1.3. Activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des différents extraits des deux plantes a été réalisée par trois méthodes chimiques différentes : le piégeage du radical libre DPPH, la méthode NBT et la détermination de la capacité antioxydante totale.

Les résultats de cette investigation sont d'abord exprimés séparément pour chacune des trois méthodes utilisées. Par la suite, les différentes corrélations sont données succinctement entre chaque méthode et la concentration des extraits en polyphénols.

1.3.1. Méthode DPPH

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour l'extrait d'éthanol et l'extrait aqueux des deux plantes ainsi que pour les deux témoins positifs : BHT et Vitamine C. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

L'activité antioxydante DPPH des extraits indique leurs capacités à céder des atomes d'hydrogène. Ainsi, une valeur faible d'IC₅₀ indique une activité antioxydante forte. Le pourcentage d'inhibition (% I) pour chaque échantillon a été calculé. Les essais ont été réalisés en triplicata et les résultats sont exprimés en valeur d'IC₅₀ ± SE (Ecart standard).

La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'échantillons préparés.

Tableau VI. Activités antioxydantes des extraits de plantes, mesurées par la méthode DPPH et exprimées en IC₅₀

	IC ₅₀ de l'extrait (µg/ml)	
	Extrait à l'éthanol	Extrait aqueux
<i>Borago officinalis</i>	92,85 ± 3,07	150,37 ± 0,99
<i>Urtica dioica</i>	95,21 ± 1,71	152,34 ± 0,37
BHT	22,5 ± 0,62	
Vit C	3,14 ± 0,36	

Les valeurs données représentent la moyenne de trois mesures ± SE

La comparaison des IC₅₀ par rapport aux deux témoins positifs montre que l'extrait éthanolique de *Borago officinalis* possède la plus forte activité antioxydante 92,85 ± 3,07 µl/ml, suivi par l'extrait éthanolique d'*Urtica dioica* 95,21 ± 1,71 µl/ml ensuite l'extrait aqueux de *Borago officinalis* 150,37 ± 0,99 µl/ml.

En fin, la plus faible activité est enregistrée pour l'extrait aqueux d'*Urtica dioica* $152,34 \pm 0,37 \mu\text{l/ml}$.

1.3.2. Méthode NBT

Dans un second essai, l'activité antioxydante a été déterminée à partir de l'inhibition de l'oxydation du NBT et ceci en inhibant la formation des anions superoxyde $\text{O}_2^{\cdot -}$.

Tableau VII. Activités antioxydantes des extraits de plantes mesurées par la méthode NBT

	IC ₅₀ de l'extrait (μg/ml)	
	Extrait à l'éthanol	Extrait aqueux
<i>Borago officinalis</i>	175,73 ± 0,60	346,25 ± 3,52
<i>Urtica dioica</i>	272,23 ± 2,54	353,15 ± 0,70
BHT	289,27 ± 6,23	
Vit C	167,47 ± 1,40	

Les valeurs données représentent la moyenne de trois mesures ± SE

D'après les résultats présentés dans le tableau 7, il apparaît que l'extrait éthanolique de *Borago officinalis* possède la plus grande activité antioxydante avec un IC₅₀ de $175,73 \mu\text{l/ml}$ et est plus efficace contre les anions superoxyde que le BHT ($289,27 \mu\text{l/ml}$). Ensuite, vient en seconde position l'extrait éthanolique d'*Urtica dioica* ($272,23 \mu\text{l/ml}$).

La plus faible activité est enregistrée par les extraits aqueux des deux plantes, avec des IC₅₀ de $346,25 \mu\text{l/ml}$ et $353,15 \mu\text{l/ml}$ pour l'extrait de bourrache et d'ortie, respectivement.

On constate, ici, que contrairement aux résultats du test DPPH, l'extrait aqueux d'*Urtica dioica* est moins actif contre les anions superoxyde que l'extrait aqueux de bourrache.

1.3.3. Activité antioxydante totale

La courbe $DO_{\lambda 695nm} = f(C_{\text{échantillon}})$ est tracée. La projection du point correspondant à une DO égale à un (01) sur l'axe des abscisses, permet de calculer l'activité de chaque échantillon en l'exprimant par $\mu\text{g/ml}$ d'extrait. Les résultats sont le rapport entre les témoins positifs et les extraits des deux plantes. Ils sont exprimés en μg témoin positif (BHT ou Vit C) par μg d'extrait suite au calcul du rapport suivant : $x_{\text{étalon}} (\mu\text{g/ml}) / x_{\text{extrait}} (\mu\text{g/ml})$. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 8.

Tableau VIII. Activité antioxydante totale des quatre extraits de plantes

	BHT ($\mu\text{g BHT}/\mu\text{g d'extrait}$)		Vit C ($\mu\text{g vit C}/\mu\text{g d'extrait}$)	
	Extrait à l'éthanol	Extrait aqueux	Extrait à l'éthanol	Extrait aqueux
<i>Borago officinalis</i>	$1,374 \pm 0,21$	$0,887 \pm 0,04$	$0,912 \pm 0,02$	$0,589 \pm 0,03$
<i>Urtica dioica</i>	$0,911 \pm 0,01$	$0,876 \pm 0,03$	$0,605 \pm 0,02$	$0,582 \pm 0,04$

Les valeurs données représentent la moyenne de trois mesures \pm SE

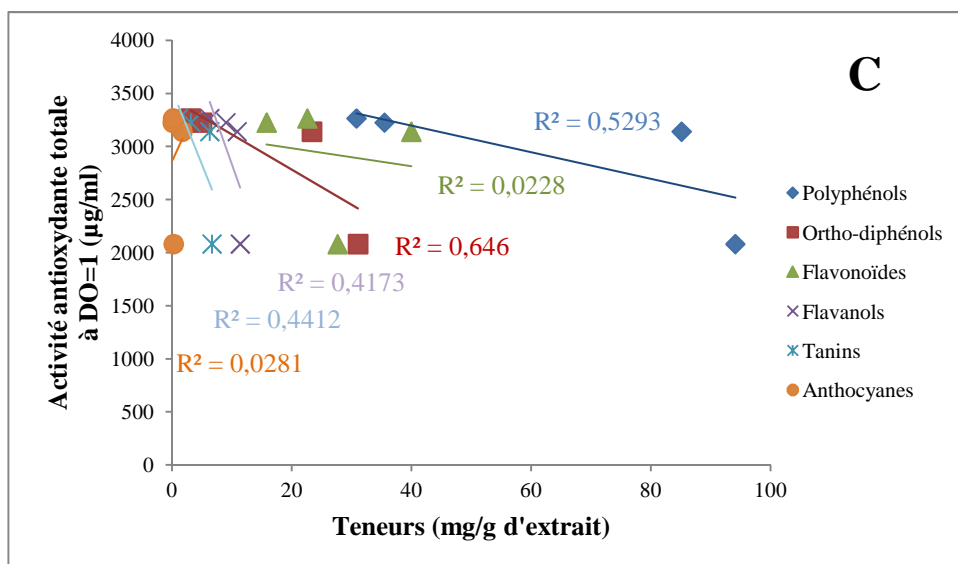
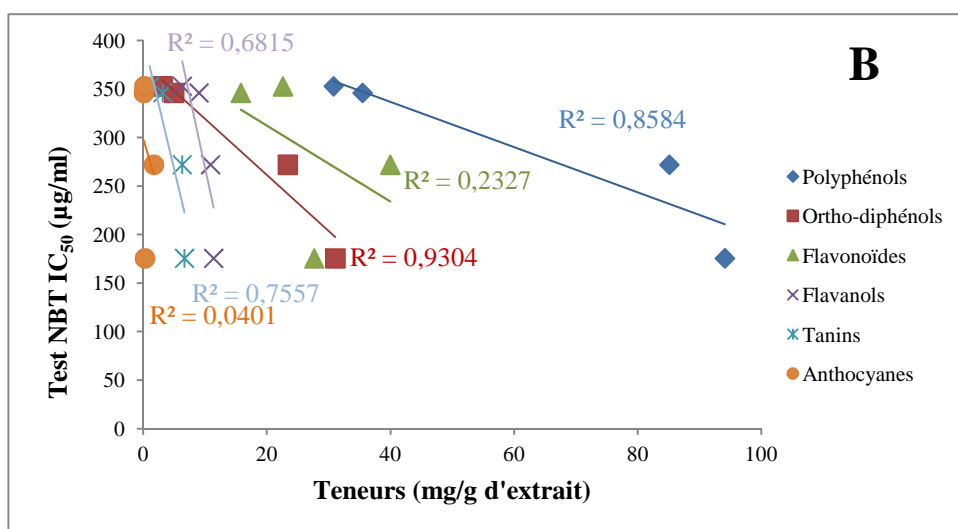
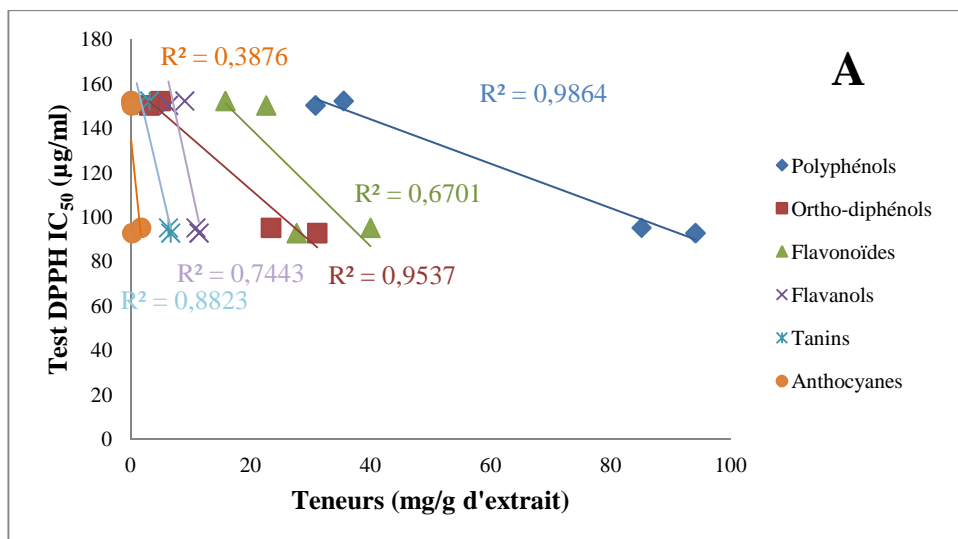
Nous constatons que seule l'activité de l'extrait éthanolique de *Borago officinalis* est supérieure à celle du BHT avec un rapport de $1,37 \pm 0,21$. Alors que les autres extraits possèdent de faibles activités par rapport aux deux témoins positifs mais qui demeurent néanmoins intéressantes.

Nous remarquons, comme c'était le cas pour les tests précédents que les extraits éthanoliques ont une plus forte activité antioxydante par rapport aux extraits aqueux.

1.4. Etude des corrélations

Dans le but de confirmer l'efficacité des méthodes de dosage et des activités mesurées, la figure 41 montrent les courbes de corrélation entre chaque méthode de mesure de l'activité antioxydante et les concentrations en phénols totaux des extraits.

Tous les phénols dosés montrent une corrélation supérieure au test DPPH suivi par le test NBT et ensuite l'activité antioxydante totale. Les plus fortes corrélations sont enregistrées entre les tests de mesure de l'activité antioxydante et la quantité en polyphénols totaux, suivis par les ortho-diphénols, les tanins, les flavanols, les flavonoïdes et enfin les anthocyanes.



R : coefficient de Pearson ; * : $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Figure 41. Corrélation entre la quantité en phénols des extraits et le test DPPH (A), le test NBT (B) et l'activité antioxydante totale (C)

❖ Discussion

L'intérêt croissant de la recherche pour les antioxydants naturels afin de remplacer les produits de synthèse, aux effets secondaires néfastes, a conduit à la valorisation d'un grand nombre de ressources végétales facilement accessibles, peu coûteuses, mais d'un intérêt certain. Ainsi, notre choix a porté sur *Borago officinalis* et *Urtica dioica*, du fait qu'elles sont des plantes médicinales locales et dont les utilisations traditionnelles dans plusieurs pathologies sont largement documentées.

D'après l'origine arabe du nom de la bourrache, la propriété la plus flagrante de la bourrache est de provoquer les sueurs, activant ainsi l'évacuation des toxines. Mais aussi, elle est dotée de propriétés : adoucissante, dépurative, diurétique et laxative. Traditionnellement, en Algérie, on reconnaît aux fleurs et aux feuilles des propriétés émoullientes. En usage externe, les feuilles fraîches écrasées calment la douleur, les abcès, les tumeurs inflammatoires, les brûlures, et leur décoction en cataplasme très chaud calme celle de la goutte (Beloued, 1998). En effet, un certain nombre de ces propriétés attribuées à la bourrache sont confirmées par des recherches scientifiques. Par exemple, son action contre les troubles gastro-intestinaux, cardiaques et respiratoires (Gilani et al., 2007) ainsi que sur l'eczéma et l'arthrite (Belch et Hill, 2000 ; Henz et al., 1999) a été scientifiquement prouvée. D'autre part, des études ont démontré une activité anti-oxydante dans des extraits de feuilles et de graines de bourrache (Conforti et al., 2008 ; Mhamdi et al., 2010a ; Mhamdi et al., 2010b). Il a été rapporté que son huile, particulièrement riche en acide γ -linoléique, abaisse les taux de cholestérol sérique, des phospholipides et des triglycérides et abaisse la pression artérielle chez des rats hyper tendus (Engler et Engler, 1998). Son huile serait également dotée de propriétés immuno-modulatrice (Harbige et al., 2000), cytotoxique et antioxydante (Bandoniene et Murkovic, 2002; Lin et al., 2002).

Quant à l'ortie, selon les traditions Algériennes, l'infusion de ses feuilles est préconisée contre le rhumatisme, la goutte et l'asthme (Beloued, 1998). Quant aux racines, elles ont révélées leurs actions antifongique (Brochaert et al., 1989), antivirale (Balzarini et al., 1992) et sur le système cardiovasculaire (Testai et al., 2002). Très étudiée, de nombreuses utilisations traditionnelles de l'ortie ont été confirmées scientifiquement. De plus la composition chimique de divers extraits d'ortie a été élucidée par plusieurs études : pour l'extrait aqueux d'ortie par exemple, Güler (2013) a détecté la présence de l'acide caféique, l'acide gallique, la quercétine, la scopolétine, les caroténoïdes, le *secoisolariciresinol* et des anthocyanidines (annexes 2, 3 et de 7 à 9).

Par ailleurs, des études cliniques, ont montré l'efficacité des feuilles d'ortie, en usage externe, sur les douleurs articulaires (Randall et *al.*, 2000) ainsi que leur utilisation interne dans l'arthrite, les rhumatismes (Chrubasik et *al.*, 1997) et la rhinite allergique (Mittman, 1990). Plusieurs autres recherches ont confirmé les propriétés anti-inflammatoire (Kavalali, 2003), immunomodulatrice (Akabay, 2003) et analgésique (Tita, 1993) des parties aériennes de la plante, ainsi que leurs activités sur le système nerveux central (Tahri et *al.*, 2000).

D'après cette riche littérature concernant les deux plantes, nous supposons qu'elles peuvent être utilisées comme sources potentielles de composés bioactifs, notamment à activité antioxydante mais aussi à activité antiasthmatique. Ainsi avant de tester leurs effets sur un modèle d'asthme expérimental, nous nous sommes attelé à mettre en évidence les différents composés chimiques notamment phénoliques que peuvent contenir ces deux plantes ainsi qu'à révéler leurs pouvoirs antioxydants respectifs via un certain nombre de dosages spectrophotométriques.

C'est ainsi que les extraits éthanoliques des deux plantes ont révélé des teneurs plus élevées en polyphénols totaux et une meilleure capacité antioxydante que les extraits aqueux, probablement en raison de la polarité et la bonne solubilité des composés phénoliques dans l'éthanol (Siddhuraju et Becker, 2003). En fait, l'éthanol (solvant moyennement polaire) solubilise correctement des composés phénoliques moyennement polaires et peut entraîner aussi des substances lipophiles résiduelles. L'addition de l'eau (solvant fortement polaire) au système d'extraction fait améliorer le rendement en composés phénoliques glycosylés et des phénols avec un degré de polymérisation plus élevé. Bonnaillie et *al.* (2012) ont rapporté que les composés phénoliques ont tendance à être extraits plus avec le mélange éthanol-eau qu'avec les solvants purs (Bonnaillie et *al.*, 2012). De plus, la solubilité des polyphénols est étroitement liée au degré de polymérisation en raison de l'augmentation de nombre de groupe hydroxyles – OH (Savova et *al.*, 2007). Par ailleurs, il est certain que le développement de procédés plus économes en solvants pourra servir de perspectives pour optimiser au mieux l'extraction en vue de l'utilisation à l'échelle industrielle des extraits de nos plantes.

La quantité totale de phénol dans l'extrait éthanolique de *Borago officinalis* ($94,09 \pm 1.72$ mg AG/g d'extrait) s'accorde avec celle trouvée par Conforti et *al.* (2008). Mais l'extrait étudié présente une teneur plus élevée en flavonoïdes et une activité antioxydante plus faible par rapport aux résultats déclarés pour la bourrache italienne par Conforti et *al.* (2008).

Alors que les concentrations en polyphénols de l'extrait éthanolique d'*Urtica dioica* sont faibles par rapport à celles trouvées par Güder et Korkmaz (2012) évaluées à 132,0 mg/g

d'extrait et plus ou moins faible pour l'extrait aqueux par rapport aux résultats de Kaledaite et Bernatoniene (2011).

Par contre, nous pouvons observer que l'extrait à l'éthanol d'*Urtica dioica* possède la concentration la plus élevée en flavonoïdes bien que nous avons constaté qu'il est moins riche en phénols totaux que *Borago officinalis*, toutefois, cette concentration estimée à 39,96 mg QE/g d'extrait est faible par rapport à celle trouvée dans les travaux de (Güder et Korkmaz, 2012). Alors que nos résultats pour l'extrait aqueux d'ortie s'accordent parfaitement avec ceux de Güler (2013).

D'autre part, nos quatre extraits ont des concentrations assez faibles en tanins et en anthocyanes, ces derniers se trouvent généralement dans les fruits et fleurs et leurs donnent leurs pigmentation (voir la partie bibliographique chapitre III).

Ainsi, les différences dans les teneurs constatées par comparaison à ceux des autres plantes de la même espèce c'est à dire *Borago officinalis* et *Urtica dioica*, sont probablement dues à l'influence du climat car la synthèse des polyphénols, bien que sous la dépendance de facteurs génétiques, elle est particulièrement sensible aux changements de conditions du milieu notamment l'état hydrique, la période de maturation, la température et le rayonnement (Hossain et Shah, 2011).

De cette richesse en polyphénols découle forcément une activité antioxydante que nous avons tenté d'évaluer via trois méthodes (DPPH, NBT et activité antioxydante totale).

L'activité antioxydante DPPH de nos extraits indique leurs capacités à céder des atomes d'hydrogènes. La comparaison des IC₅₀ par rapport aux deux témoins positifs montre que l'extrait éthanolique de *Borago officinalis* possède la plus forte activité antioxydante, suivi par l'extrait éthanolique d'*Urtica dioica* ensuite l'extrait aqueux de *Borago officinalis* et enfin la plus faible activité est enregistrée pour l'extrait aqueux d'*Urtica dioica*.

En outre, les résultats de l'activité antioxydante DPPH de l'extrait éthanolique des feuilles de *Borago officinalis* ont montré une activité supérieure à celles rapportées par Mhamdi et al. (2010a) pour l'extrait méthanolique des feuilles de la bourrache tunisienne.

Nos travaux montrent aussi que nos deux extraits d'*Urtica dioica* ont une activité antioxydante contre le radical DPPH plus importante que celle des travaux effectués auparavant sur la même plante (Güler, 2013 et Güder et Korkmaz, 2012).

L'extrait éthanolique des feuilles d'*Urtica dioica* a une activité supérieure à l'extrait méthanolique dont l'IC₅₀ a été estimée à 419 ± 10µg/ml par Dall'Acqua (2008). Quant aux tests d'activité antioxydante totale et NBT, les résultats montrent que l'extrait de bourrache à l'éthanol a une meilleure activité antioxydante que le BHT.

Ainsi, les conditions environnementales et la répartition géographique différentielle, pouvant modifier la constitution des plantes en composés phénoliques et leurs dérivés (acides phénoliques, flavonoïdes... etc.), a aussi induit des différences dans leur pouvoir antioxydant (Hossain et Shah, 2011). Par exemple, les activités antioxydantes des acides phénoliques et leurs dérivés, tels que les esters, dépendent du nombre de groupes hydroxyle dans les molécules (Soobrattee et *al.*, 2005). En outre, il a été rapporté que l'activité antioxydante des flavonoïdes est à peu près proportionnelle au nombre total de groupement -OH et est positivement influencée par la présence d'un fragment o-dihydroxy dans le cycle B (Apak et *al.*, 2008). Dans certaines études, une forte corrélation a même été retrouvée (Velioglu et *al.*, 1998).

Ainsi, étant donné que l'activité antioxydante des extraits de plantes est généralement liée à leur teneur en composés phénoliques, nous en avons évalué la corrélation tout en comparant les deux ressources végétales ensemble et aux données de la littérature.

Nos résultats ont montré une corrélation négative significative entre l'activité antioxydante mesurée par le test DPPH et la teneur en polyphénols et en ortho-diphénols avec un coefficient de corrélation de -0,99 ($p \leq 0,01$) et -0,97 ($p \leq 0,05$), respectivement. De même, il existe une corrélation négative significative entre le test NBT et la teneur en polyphénols (-0,92 ; $p \leq 0,05$) et en ortho-diphénols (-0,96 ; $p \leq 0,05$). Vu que l'extrait le plus riche en phénols totaux est le plus actif contre les radicaux libres, ceci est en accord avec l'idée que les composés phénoliques ont un rôle clé dans le piégeage des radicaux libres.

Nombre d'études s'accordent avec le fait qu'il y a une forte corrélation entre le taux de polyphénols et l'activité antioxydante (Velioglu et *al.*, 1998) comme c'est le cas pour les deux premières méthodes (test DPPH et test NBT). Cependant, d'autres études affirment que l'activité antioxydante dépend de façon qualitative et quantitative de la composition phénolique de l'extrait (Shahidi et Marian, 2003) comme cela doit être le cas pour l'activité antioxydante totale, la réduction du molybdate d'ammonium (VI) en Molybdate d'ammonium (V) par l'extrait ne dépend pas que de la quantité de polyphénols présente dans ce dernier mais aussi de leurs nature (acides phénoliques, flavonoïdes...etc.).

Il serait donc intéressant d'identifier les composés phénoliques présents dans nos extraits pour pouvoir expliquer ces résultats, car Soobrattee et *al.* (2005) ont montré que l'augmentation du pouvoir réducteur dépend du nombre de groupements hydroxyles présents dans les molécules et de leurs positions (*para* ou *ortho*).

1.5. Résultats de l'analyse par LC MS/MS

En utilisant l'appareil LC MS/MS, il a été possible d'identifier une grande partie des composés des extraits de plantes analysés. La bourrache (*Borago officinalis*) étant très peu étudiée, nous avons choisi d'analyser ses deux extraits (aqueux et éthanolique). Par contre, pour l'ortie (*Urtica dioica*), seul l'extrait le plus actif a été étudié, à savoir l'extrait d'éthanol.

Le tableau 9 résume les trente-cinq (35) composés identifiés au cours de notre présente étude.

On note l'existence de plusieurs familles de molécules et leurs dérivés : telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les séco-iridoïdes, les coumarines, ainsi que les aldéhydes phénoliques, les stérols, les mono-terpènes glucosides et même certains acides gras.

Toutes ces molécules ont été caractérisées d'une part grâce à l'étude de leur fragmentation obtenue par ESI-MS/MS en modes positif et négatif, et d'autre part par comparaison aux données de la littérature.

1.5.1. Résultats de l'analyse par LC MS/MS pour les extraits de *Borago officinalis*

Les chromatogrammes des figures 42 et 43 représentent les profils des deux extraits de la bourrache (extrait aqueux et éthanolique, respectivement) en modes positif et négatif.

Au total, vingt-deux (22) pics ont été identifiés dans *Borago officinalis*. Pour chacun des pics chromatographiques, les temps de rétention, les UV, la formule chimique, les masses et les fragments en mode négatif ou positif sont mentionnés dans le tableau 10.

Onze seulement de ces constituants ont été identifiés dans l'extrait aqueux de la plante et 15 constituants sont contenus dans son extrait éthanolique.

Nous citons ci-dessous les démarches d'identification pour chacun des composés retrouvés et ce pour les deux extraits de la bourrache.

Tableau IX. L'ensemble des composés identifiés dans les extraits de bourache et d'ortie

Famille	Composés identifiés dans les extraits de <i>Borago officinalis</i>		Composés identifiés dans l'extrait d'éthanol d' <i>Urtica dioica</i>
	Extrait aqueux	Extrait d'éthanol	
Acides phénoliques et dérivés	Acide m-Geranyl-p hydroxybenzoïque (1)	Acide m-Geranyl-p hydroxybenzoïque (1)	Féruloyl malate (10)*
	Acide p-hydroxyphényl lactique (4)	Acide caféïque (17)	Acide caféïque (7)*
	Acide Dihydrofêrulique (8)	Acide Sinapique hexoside (5)	Acide dihydrofêrulique (4)*
	Acide 3,4-Dimethoxycinnamique (16)	Acide Lithospermique B (6)	-
	Coumaroyl hydroxyagmatine (20)	Acide Cafêoyl shikimate (2)	-
	Acide 4-Hydroxybenzoïque glucoside (22)	Acide 4-Hydroxybenzoïque glucoside (22)	-
Flavonoïdes et dérivés	Lutéoline 7,3',4'-triméthyle éther (18)	Quercétine-3-O-glucoside (7)	Isorhamnétine (2)*
	Kaempférol 3,7,4'- triméthyle éther (19)	Lutéoline 7-O-glucoside (10)	Eriodictyol O-glucoside (5)*
	-	Quercétine-3-O-rhamnoside (11)	Baicaline (6)*
	-	Catéchine-7-O-glucoside (12)	Acide japonique (12)*
	-	Apigénine 8-C-glucoside (Vitexine) (14)	-
	-	Apigénin 6-C- glucoside (isovitexine) (15)	-
	Naringénine O-hexosides (21)	Naringénine O-hexosides (21)	-
Séco-iridoïdes	Oleuropéine (13)	-	-
Coumarine	-	-	Ombellifêrone (1)*
Aldéhyde phénolique	Syringaldéhyde (3)	Syringaldéhyde (3)	-
Stérol	-	β-Sitostérol (9)	-
Mono-terpène glucoside	-	-	Pinène-ol-O-glucoside (8)*
Acyle gras glucoside	-	-	Hexenyl primeveroside (3)*
Acides gras	-	-	Acide dodecanedioïque (9)*
	-	-	Acide dihydroxy-octadecatrienoïque (11)*
	-	-	Acide 9-hydroxy-octadecatrienoïque (13)*
Nombre total de composés identifiés/extrait	11	15	13

NB: les chiffres entre parenthèses représentent les numéros des pics des composés identifiés dans les extraits de *Borago officinalis* (1 à 22) et d'*Urtica dioica* (1 à 13)*

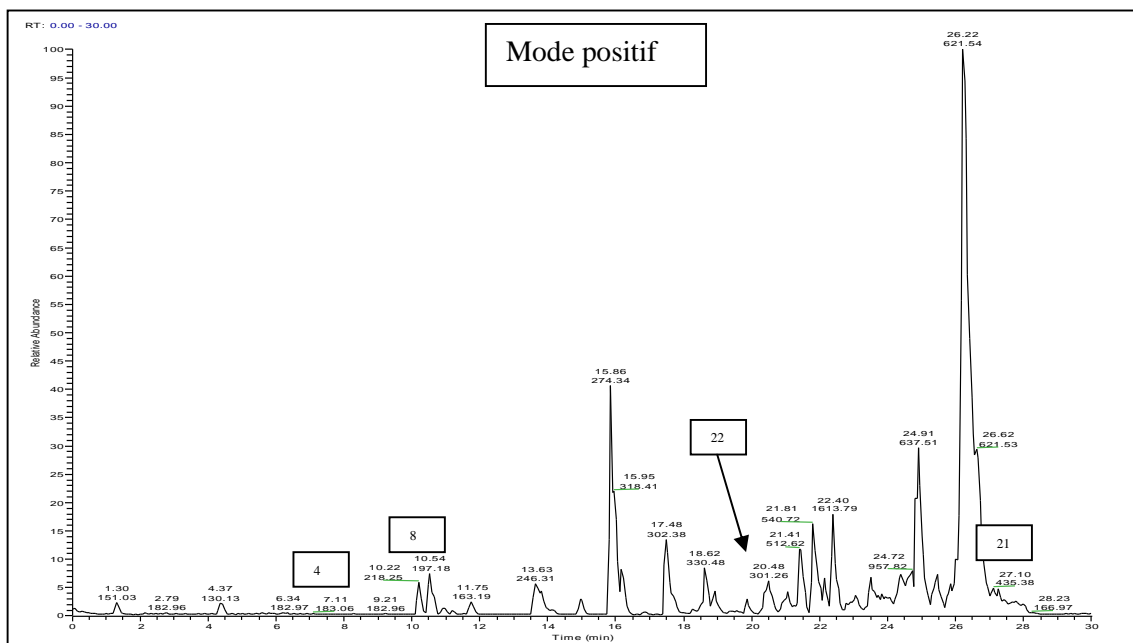
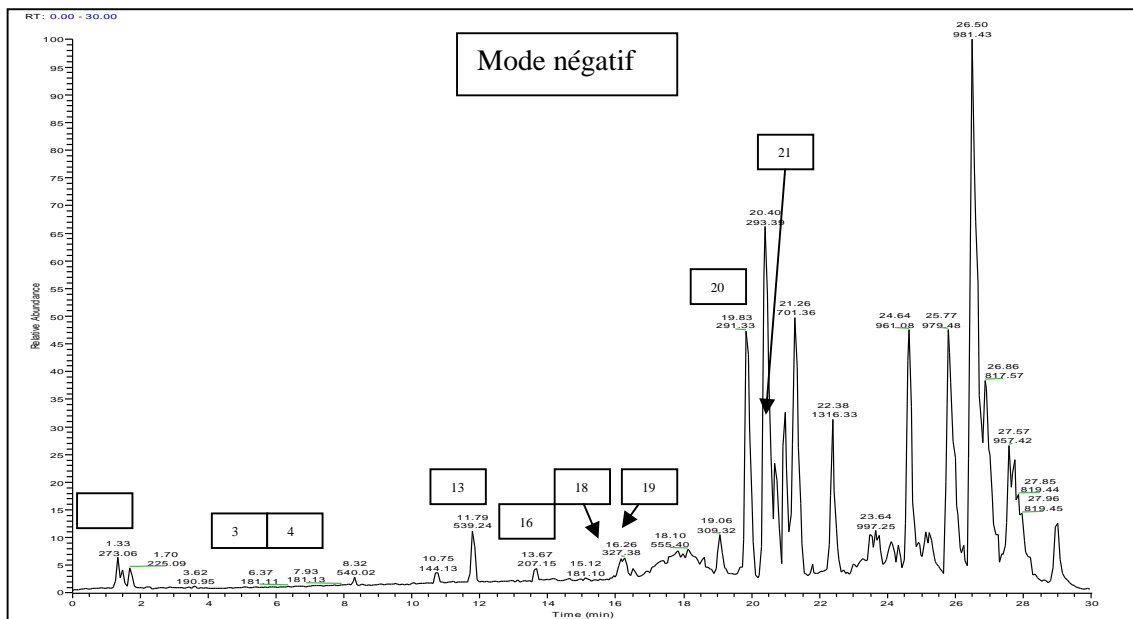


Figure 42. Profils des chromatogrammes dans les modes positif et négatif de l'extrait aqueux de *Borago officinalis* obtenus par LC MS/MS

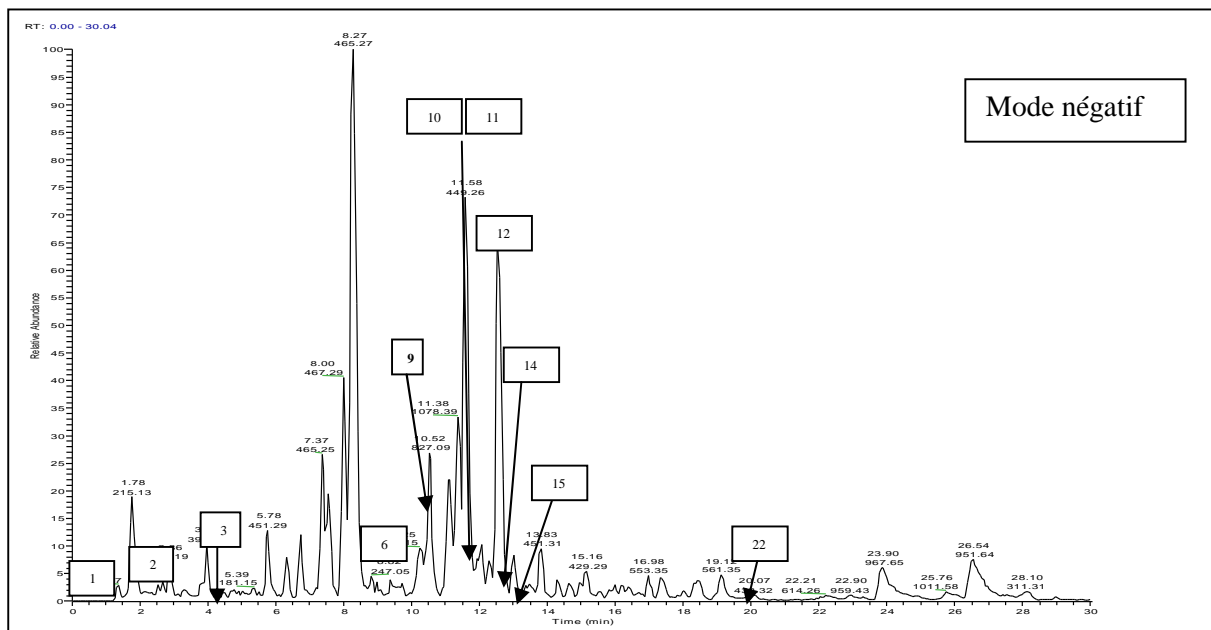
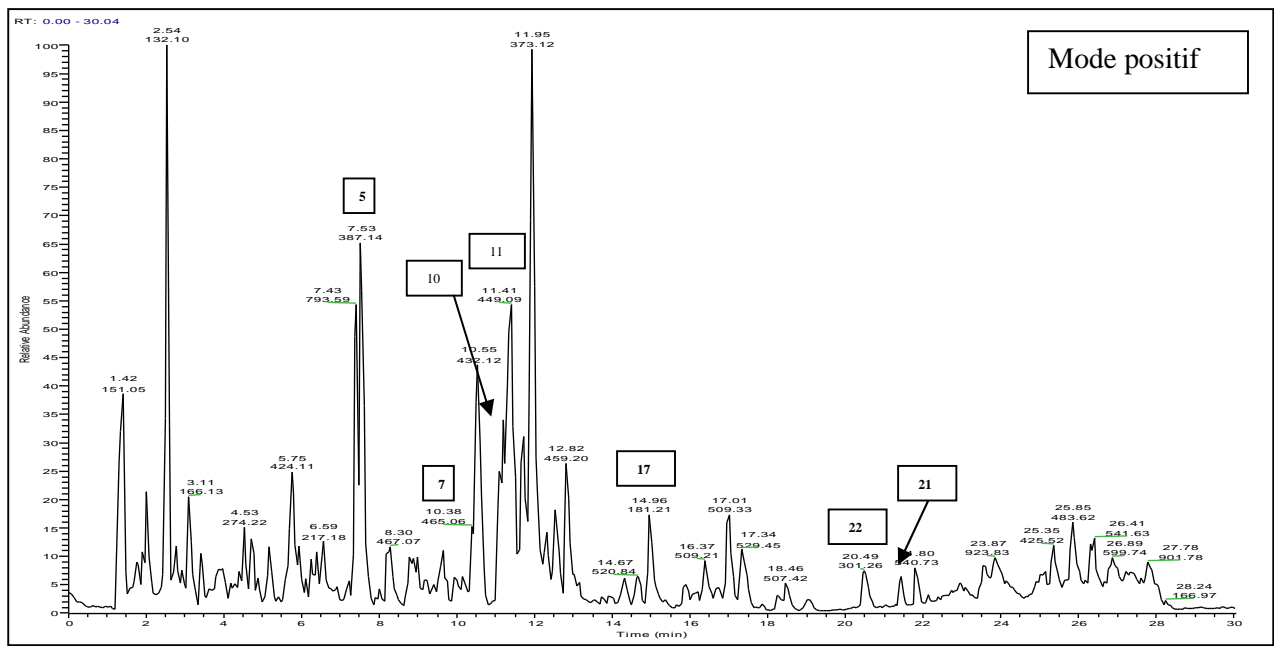


Figure 43. Profils des chromatogrammes dans les modes positif et négatif de l'extrait d'éthanol de *Borago officinalis* obtenus par LC MS/MS

Tableau X. Composés identifiés par LC MS/MS dans les extraits de *Borago officinalis*

N° Pic	TR (min)	UV (nm)	Formule chimique	Extraits	[M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	MS/ MS	Tentative d'identification
1	1.33	256	C ₁₇ H ₂₂ O ₃	a,b	273	nd	Acide m-Geranyl-p hydroxybenzoïque
2	2.86	325	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	a	335	317, 179, 161	Acide Caféoyl shikimate
3	5.39	362	C ₉ H ₁₀ O ₄	a,b	181	166,151	Syringaldéhyde
4	6.37/7.11	280, 340	C ₈ H ₈ O ₃	b	181/183	137, 113, 109	Acide p-hydroxyphényl lactique
5	7.53	222, 298	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀	a	/387	225, 207	Acide Sinapique hexoside
6	10.25	254, 286, 308sh, 330	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	a	717	537, 519, 493	Acide Lithospermiq B
7	10.38	260, 355	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	a	/465	303, 257, 181	Quercétine-3-O-glucoside (Isoquercétine)
8	10.54	280	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	b	/197	179, 153, 138	Acide Dihydrofêrulique
9	10.58	210	C ₂₉ H ₅₀ O	a	413/	Nd	β-Sitostérol
10	11.65/11.40	253, 268, 345	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	a	447/449	285, 257, 243, 213, 199	Lutéoline 7-O-glucoside
11	12.25/11.41	256, 352	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	a	447/449	301, 283, 257, 229, 179, 151	Quercétine-3-O-rhamnoside (Quercétrine)
12	12.55	278	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	a	451	289, 179, 165, 137	Catéchine-7-O-glucoside
13	11.79	254	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	b	539	377, 307, 275	Oleuropéine
14	12.96	268, 337	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	a	431	311, 269, 251, 207	Apigénine 8-C-glucoside (Vitexine)
15	13.03	270, 334	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	a	431	311, 269, 207	Apigénin 6-C- glucoside (isovitexine)
16	13.67	278	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	b	207	163, 131, 103	Acide 3,4-Diméthoxycinnamique
17	14.96	322	C ₉ H ₈ O ₄	a	/181	163, 137	Acide Caféique
18	16.25	242, 270sh, 343	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	b	327	285	Lutéoline 7,3',4'-triméthyle éther
19	16.26	266, 353	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	b	327	285	Kaempférol 3,7,4'- triméthyle éther
20	19.83	280	C ₁₄ H ₂₁ N ₄ O ₃	b	291	258, 216, 145	Coumaroyl hydroxyagmatine
21	20.07	283, 340	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	a,b	433/435	271	Naringénine O-hexosides
22	20.48	256	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	a,b	/301	139	Acide 4-Hydroxybenzoïque glucoside

(a): identifiés dans l'extrait à l'éthanol; (b) identifiés dans l'extrait aqueux ; sh: should; nd: non défini

DEMARCHE D'IDENTIFICATION DES COMPOSES DE L'EXTRAIT AQUEUX DE BOURACHE

Dans cette section, nous donnons les détails de l'identification de chacun des onze composés de l'extrait aqueux de la bourache. Nous le rappelons, il s'agit des composés 1, 3, 4, 8, 13, 16, 18, 19, 20, 21 et 22 (tableau 10 ; figure 42).

L'identification du composé **1** élué à 1min33 et avec une absorption UV à 256nm montre un pic à $[M-H]^-$ m/z 273 pouvant être identifié comme étant l'acide **m-Geranyl-p hydroxybenzoïque** (voir figure 44) (Ramos et Kato, 2009).

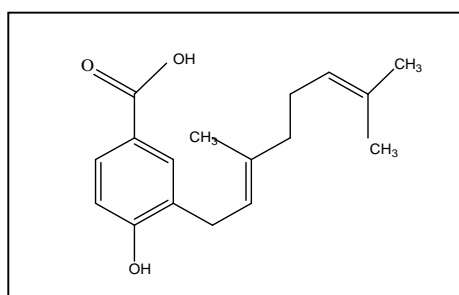


Figure 44. Structure chimique du m-Geranyl-p hydroxybenzoïque

A partir du tableau 10, nous pouvons observer que le spectre de masse en mode négatif du composé numéro **3** a montré un pic de base $[M-H]^-$ m/z 181. Dans MS^2 , les fragments m/z 166 et 151 correspondent, respectivement, à la perte d'un CH_3 et d'un C_2H_6 (probablement la perte de deux méthyles à partir de deux substitués méthoxy : 30 uma) (figure 45). Ces données ainsi que le spectre UV permettent de supposer que le composé **3** est le **syringaldéhyde**, décrit précédemment dans l'étude de Sanz et *al.* (2012).

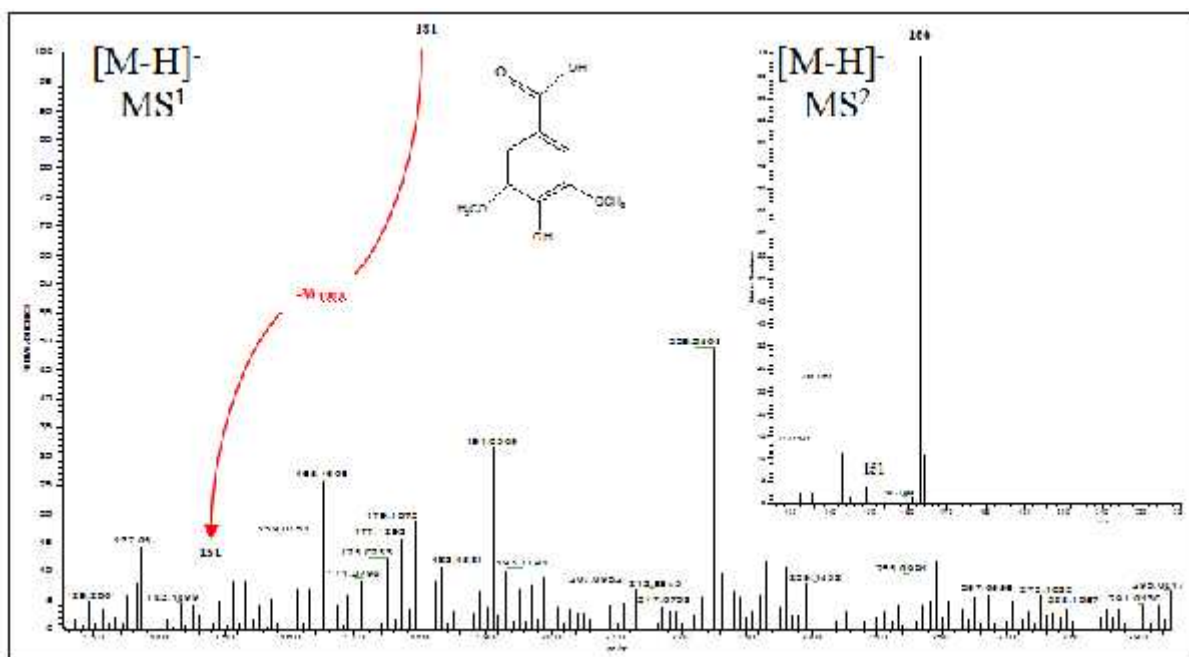


Figure 45. Spectre de masse [M-H]⁻ en MS1 et MS2 du composé 3 à m/z 181

Le composé 4 avec un ion [M-H]⁻ à m/z 181 a été identifié comme étant l'**acide lactique p-hydroxyphényle**. Son spectre typique (voir figure 46) révèle la fragmentation à m/z 137, en raison de la perte du groupement -CO₂ comme décrit précédemment par Santos et *al.* (2010).

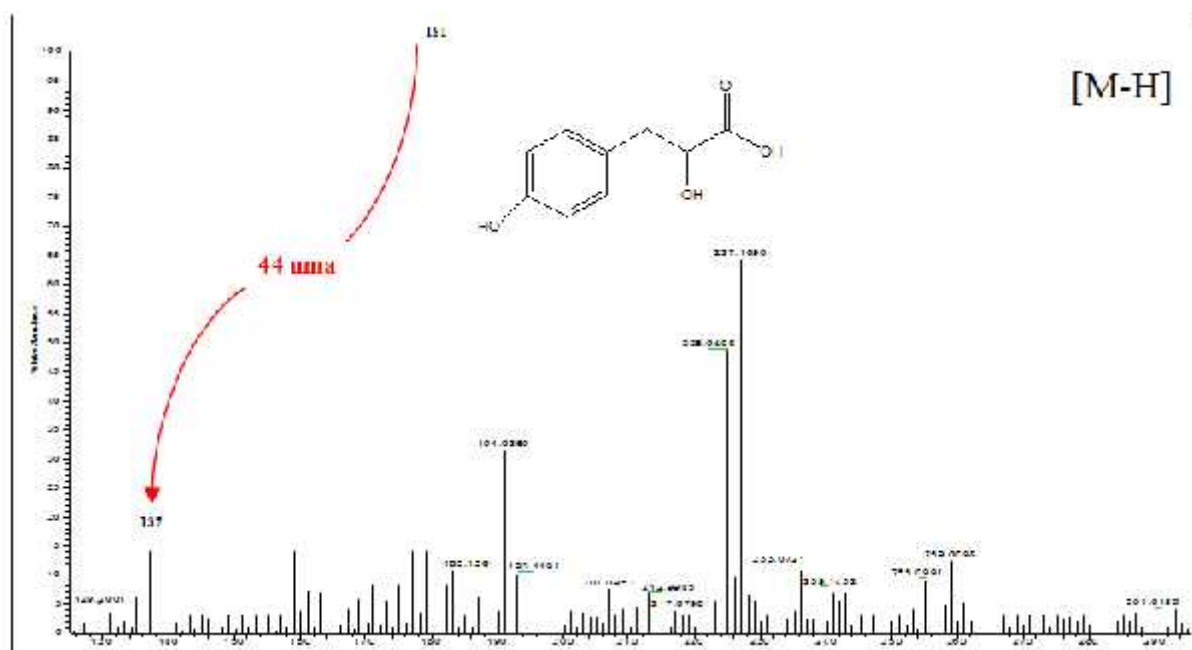


Figure 46. Spectre de masse [M-H]⁻ du composé 4 à m/z 181

Le temps de rétention les spectres UV et de masses montrent que le composé **8** est l'**acide dihydrofêruli** (figure 47). En effet, l'ion produit à $[M + H]^+$ m/z 197 et les fragments (m/z 179, 153 et 138) sont caractéristiques à ce composé (Martínez-Huélamo et al., 2015). Ils représentent la perte d'une molécule de H₂O (-18uma), de CO₂ (-44uma) et de groupements CH₃/CO₂ (-59uma).

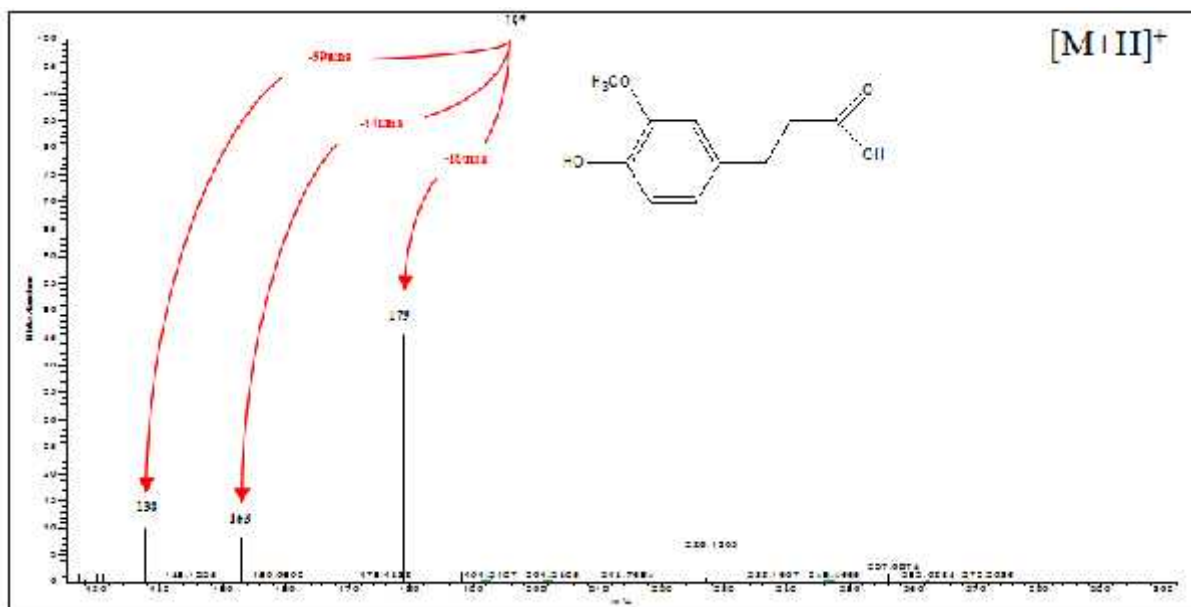


Figure 47. Spectre de masse $[M + H]^+$ du composé 8 à m/z 197

L'identification du composé numéro **13** comme l'**oleuropéine** a été réalisée par LC-MS ainsi que par l'analyse des spectres UV. Le spectre de masse ESI-MS (figure 48) a montré un ion pseudomoléculaire à m/z 539 et des fragments d'ion à m/z 377, provenant du clivage de la liaison glycosyle (figure 49). En outre, l'ion à m/z 307 s'explique par la perte d'un fragment C₄H₆O, tandis que le fragment à m/z 275 peut être estimé à partir des fragments réarrangés (De la Torre-Carbot et al., 2005).

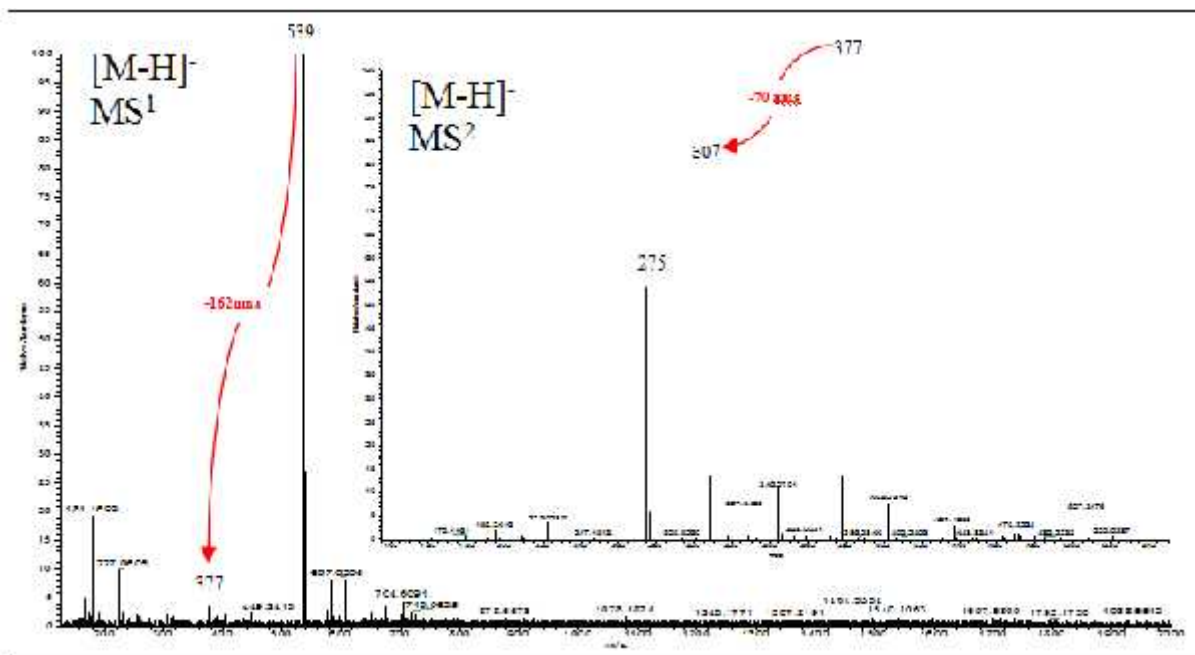


Figure 48. Spectre de masse [M-H]⁻ en MS1 et MS2 du composé 13 à m/z 539

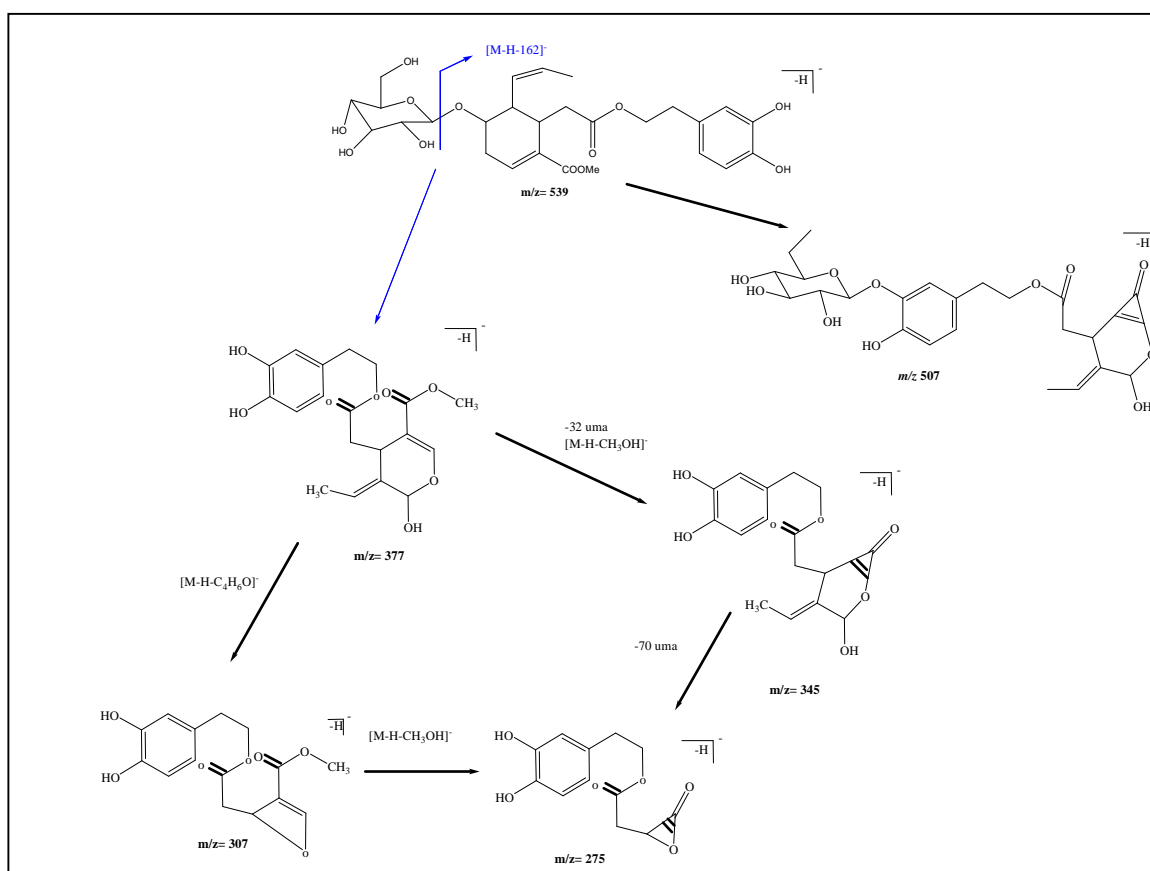


Figure 49. Schéma proposé pour la fragmentation du composé 13 (m/z 539)

Dans le mode négatif, le composé **16** montre un ion $[M-H]^-$ à m/z 207 (figure 50). Il a été identifié comme étant l'**acide 3,4-diméthoxycinnamique**. Les fragments détectés confirment l'identification où le fragment m/z 163 est dû à la perte d'une molécule CO_2 et m/z 103 à la perte d'une molécule CO_2 et un double méthoxy (Redeuil et *al.*, 2011).

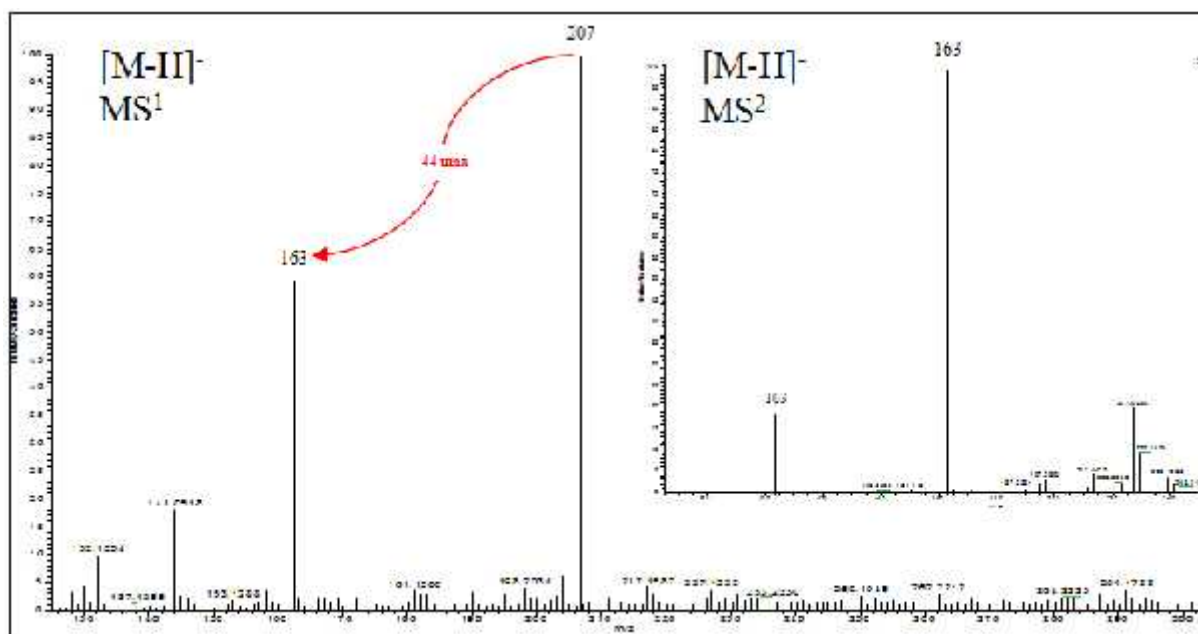


Figure 50. Spectre de masse $[M-H]^-$ en MS1 du composé **16** à m/z 207

Selon les temps de rétention et l'absorption UV comparés à la littérature (Kirmizibekmez et *al.*, 2012) nous pouvons suggérer que les composés **18** et **19** avec un ion $[M-H]^-$ m/z 327 peuvent être la **lutéoline 7,3',4'-triméthyle éther** ou **kaempférol 3,7,4'-triméthyle éther** (figure 51), où le fragment caractéristique à la lutéoline et au kaempférol est m/z 285 $[M-CH_3CO]$ (Vidari et *al.*, 1971).

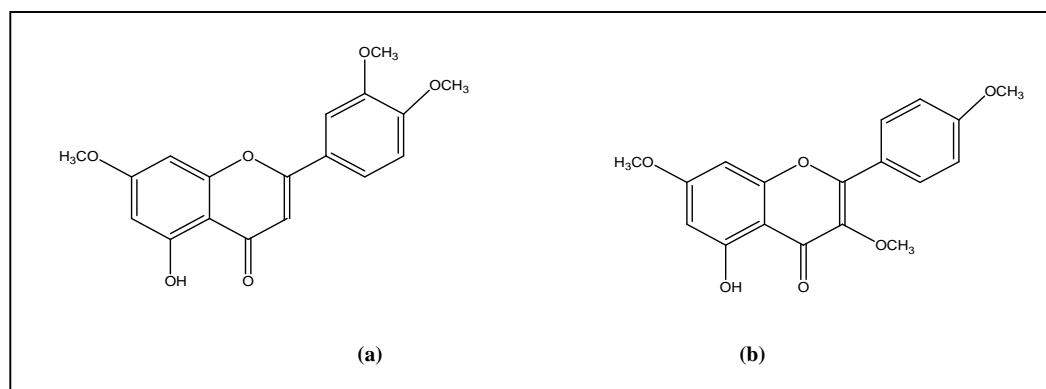


Figure 51. Structure chimique de la lutéoline 7,3',4'-triméthyle éther (a) et du kaempférol 3,7,4'- triméthyle éther (b)

Le composé **20** a été identifié comme étant le **coumaroyl hydroxyagmatine** vu l'ion à $[M-H]^-$ m/z 291 (figure 52) et le fragment m/z 145 caractéristique au fragment coumaroyl et les fragments m/z 258, 216 à l'agmatine (Lee et *al.*, 1997).

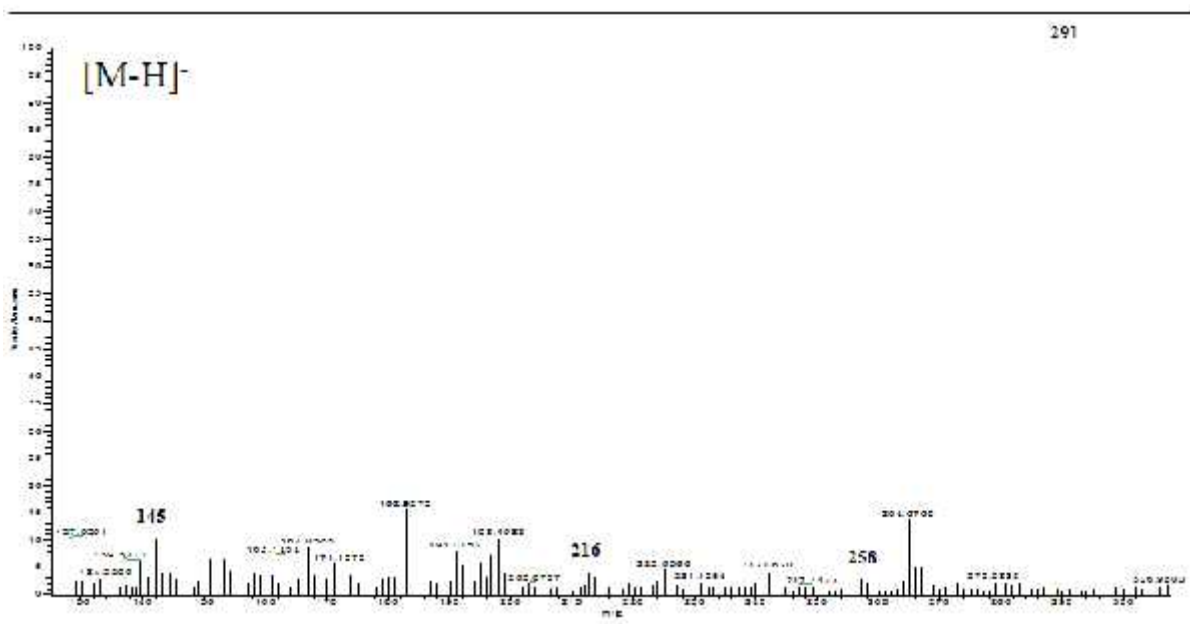


Figure 52. Spectre de masse $[M-H]^-$ du composé 20 à m/z 291

Le spectre de masse en mode négatif du composé numéro **21** a montré un pic de base $[M-H]^-$ m/z 433 (figure 53), qui a été assigné d'une O-substitution et montre un ion à m/z 271 correspondant à la perte d'un hexoside $[M-H-162]^-$. Ce qui suggère qu'il pourrait bien être la **naringénine O-hexoside**. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Falcone Ferreyra et *al.*, (2013).

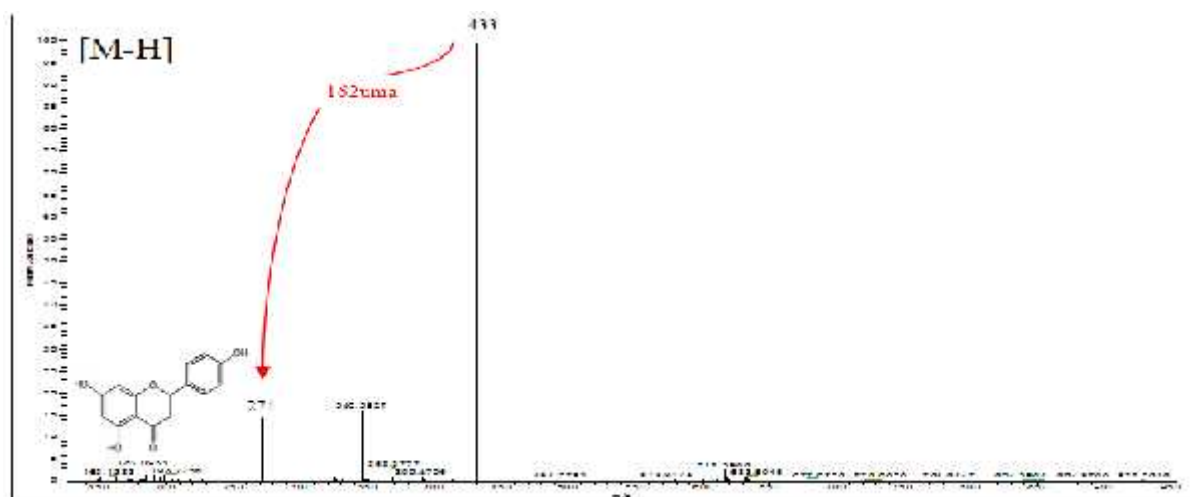


Figure 53. Spectre de masse $[M-H]^-$ du composé 21 à m/z 433

Le sucre conjugué à l'acide hydroxybenzoïque montre un ion $[M+H]^+$ à m/z 301 correspondant à l'**acide hydroxybenzoïque glucoside** (composé **22**). Son spectre MS/MS (figure 54) révèle la perte du fragment hexose en produisant l'acide hydroxybenzoïque à m/z 139. La fragmentation de ce composé a été décrite par plusieurs auteurs (Perestrelo et *al.*, 2012 ; Sanz et *al.*, 2012).

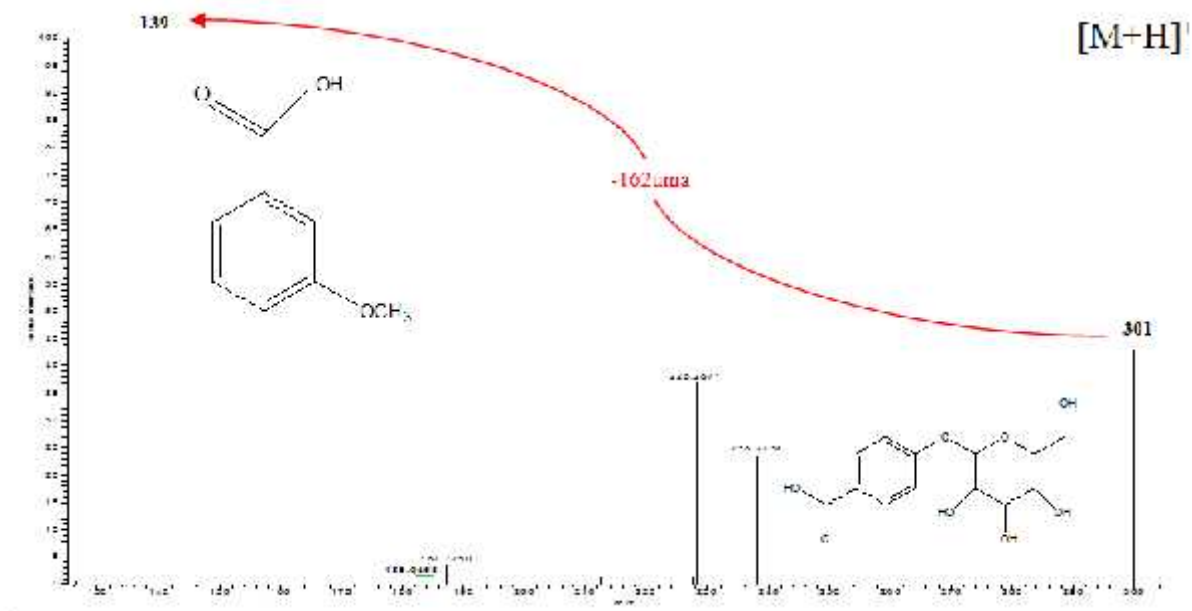


Figure 54. Spectre de masse $[M+H]^+$ du composé **22** à m/z 301

DEMARCHE D'IDENTIFICATION DES COMPOSES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE BOURACHE

Dans cette section, nous donnons les détails de l'identification de chacun des quinze composés de l'extrait éthanolique de la bourache. Nous le rappelons, il s'agit des composés 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 21 et 22 (tableau 10 ; figure 43).

Il est à noter que les composés **1**, **3**, **21** et **22** ont été identifiés dans les deux extraits de la bourache. De ce fait, nous ne répèterons pas leur identification, dans cette section, qui s'est faite de la même manière.

Le composé **2**, identifié comme étant l'**acide caféoyl shikimate** montre à $[M-H]^-$ un ion m/z 335 et un fragment à m/z 317 correspondant à une perte d'une molécule H_2O et le fragment à m/z 179 comme pic de base dans le spectre MS^2 ce qui suggère la présence de l'acide caféique (figure 55). La présence de l'acide caféique est confirmée par le fragment m/z 161, correspondant à la perte d'une molécule d' H_2O . La fragmentation de l'acide caféoyl shikimate a été décrite par Gouveia et Castilho (2011).

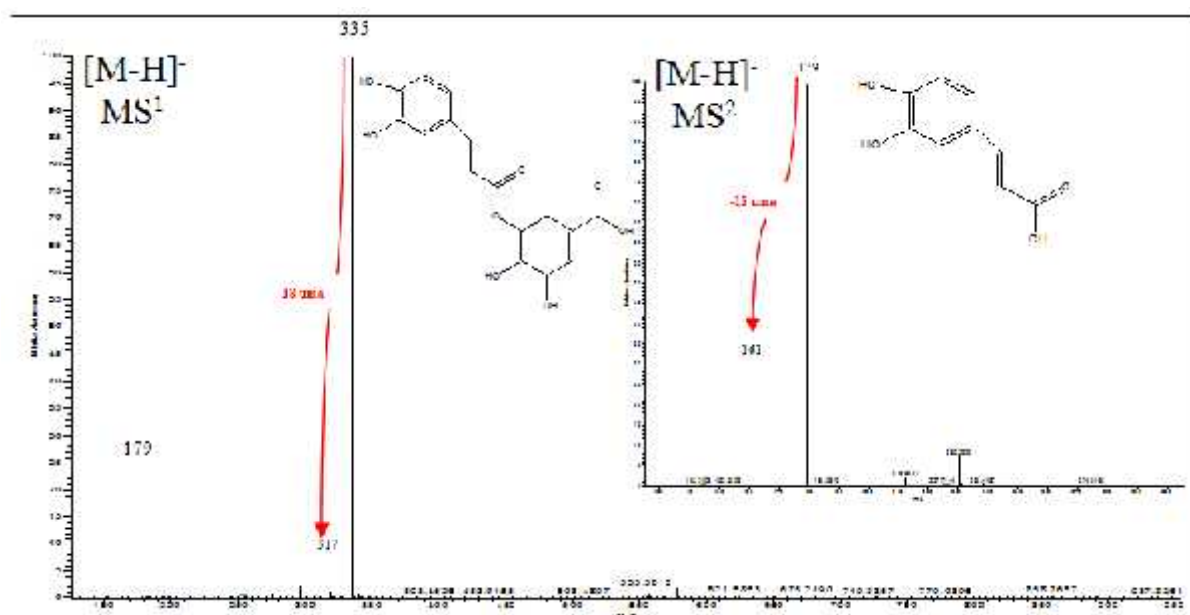


Figure 55. Spectre de masse $[M-H]^-$ en MS^1 et MS^2 du composé 2 à m/z 335

Le composé **5**: l'**acide sinapique hexose** est détecté par l'ion moléculaire $[M+H]^+$ m/z 387 et l'ion aglycone MS/MS m/z 225, représentant la perte de 162 uma. Quant à l'ion m/z 207, comme pic de bas du spectre MS , il indique la présence d'un résidu sinapoyl (Ferreres et al., 2006) (voir figure 56).

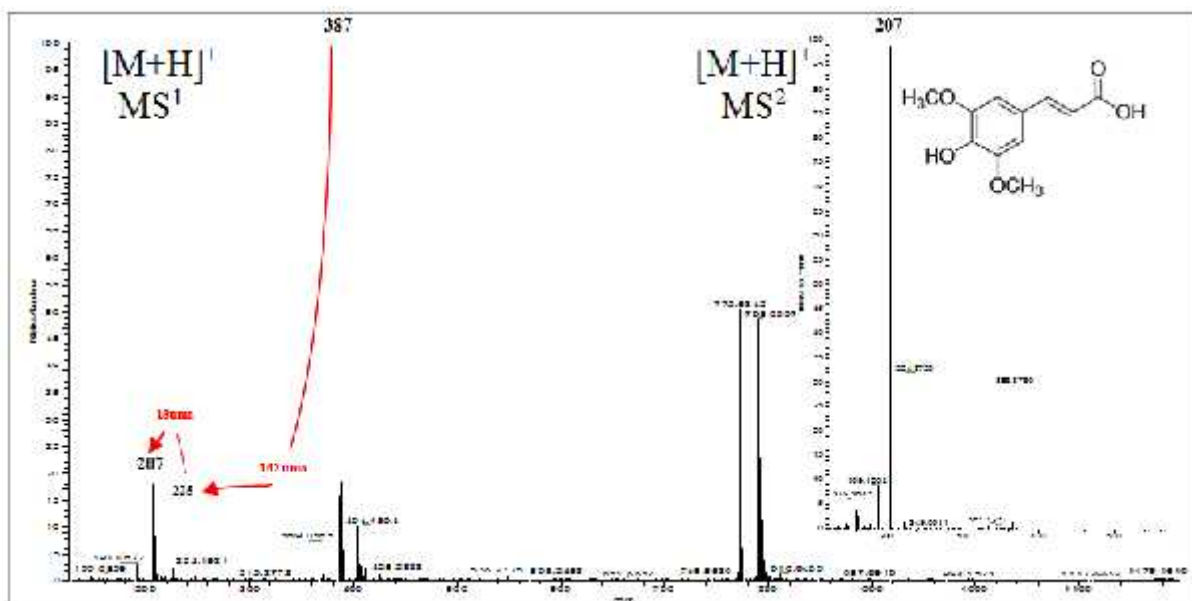


Figure 56. Spectre de masse $[M+H]^+$ en MS¹ et MS² de composé 5 à m/z 387

Le composé **6** avec l'ion $[M-H]^-$ à m/z 717 et avec une absorption UV à 254nm et un complexe de trois absorptions maximales à 286, 308 and 330 nm est connu comme étant **l'acide lithospermique B**. Comme nous pouvons le voir dans la figure 57, ceci est confirmé par la présence de l'ion m/z 537 correspondant à l'acide lithospermique et son fragment caractéristique m/z 493 indiquant la perte d'une molécule de CO₂. Alors que le fragment m/z 519 correspond à la perte d'une molécule de danshensu (m/z 198) caractéristique de l'acide lithospermique B (Grevsen et al., 2009).

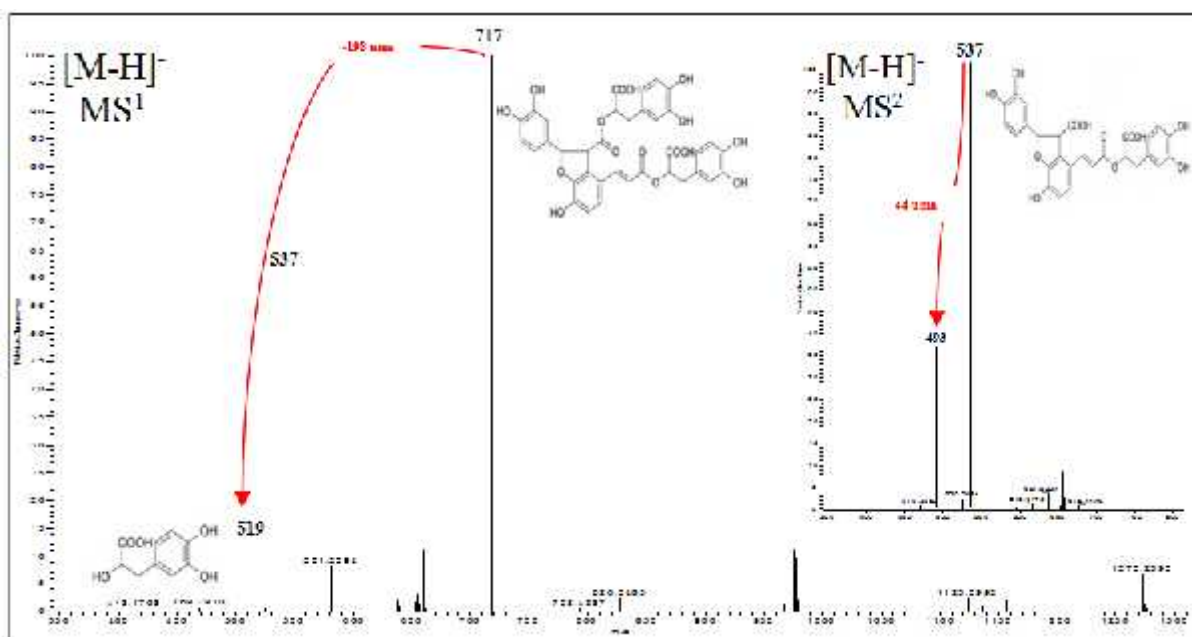


Figure 57. Spectre de masse $[M-H]^-$ en MS¹ et MS² du composé 6 à m/z 717

Le composé **7** à m/z 465 élue à un temps de rétention égale à 10.38 min, présente un pic de base observé en MS¹. En MS², le pic majoritaire est celui de l'ion à m/z 303 ce qui suggère la présence de dérivés de quercétine (figure 58 et 59). En effet, l'ion à m/z 465 [M+H]⁺ produit l'ion à m/z 303 d'où la perte d'un glucose. L'ion produit par le mécanisme de RDA attribue l'ion à m/z 181 ou bien m/z 257 par la perte de 46 uma (18 uma pour la perte de H₂O et 28 uma pour le CO). Ce mécanisme est confirmé par Silva et al. (2005) ce qui suggère qu'il s'agit de **la quercétine-3-O-glucoside** (isoquercétine).

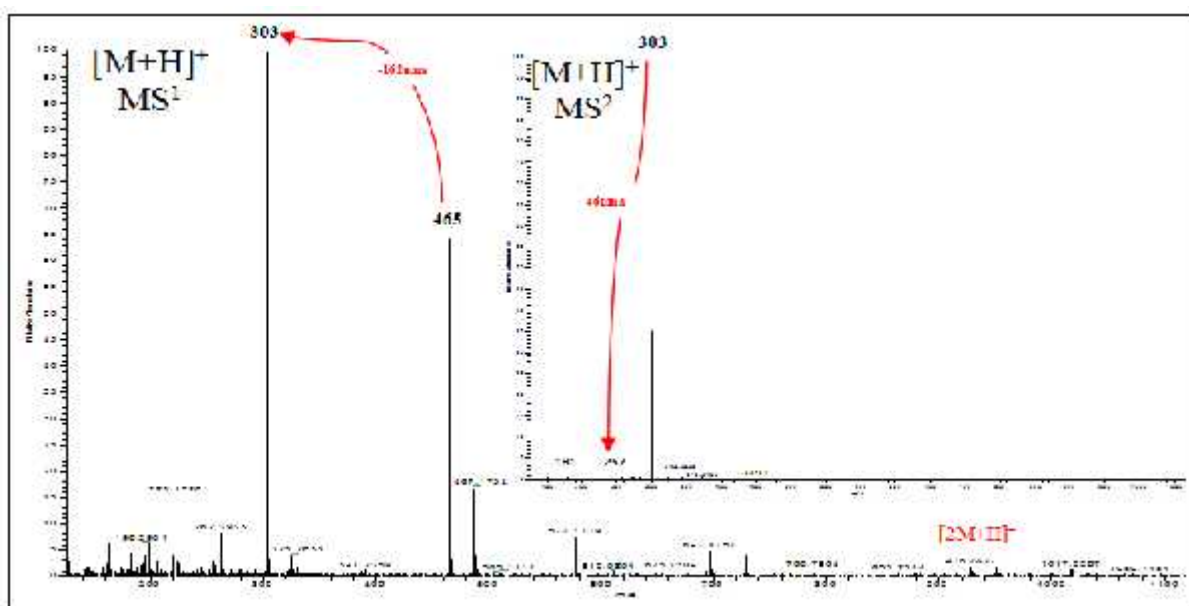


Figure 58. Spectre de masse [M+H]⁺ en MS¹ et MS² du composé **7** à m/z 465

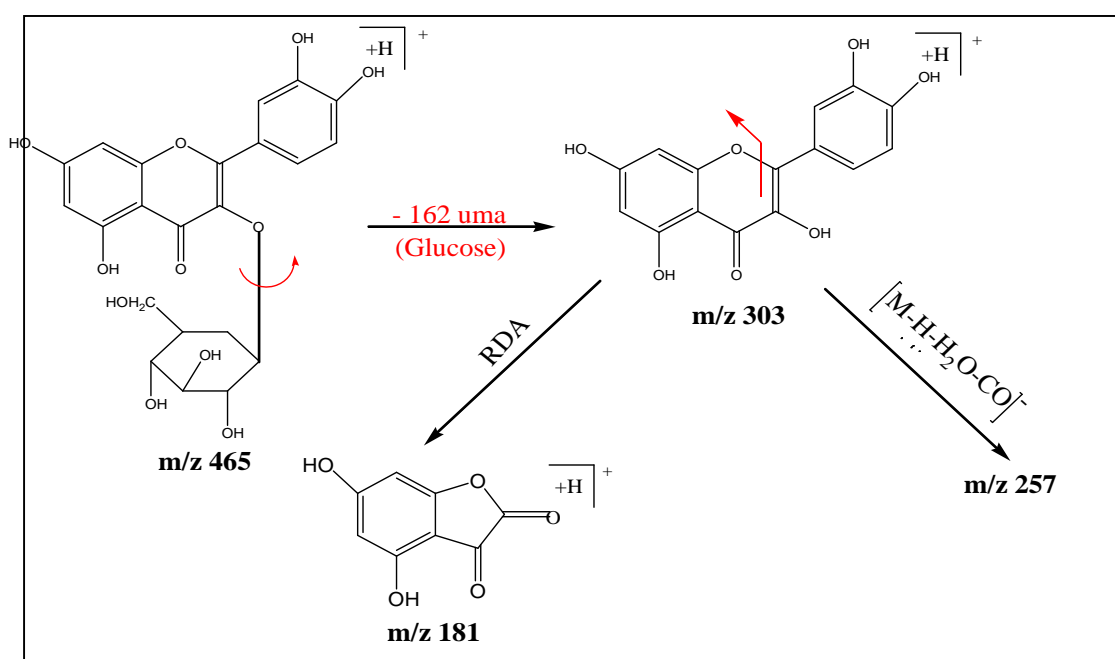


Figure 59. Schéma proposé pour la fragmentation du composé **7** à m/z 465

En comparaison à la littérature, le composé **9** (figure 60), ayant un ion $[M-H]^-$ à m/z 413 et un spectre UV d'absorption à 210nm, est de ce fait suspecté d'être le **-Sitostérol** (Chaturvedula et Prakash, 2012 ; Conforti et *al.*, 2008).

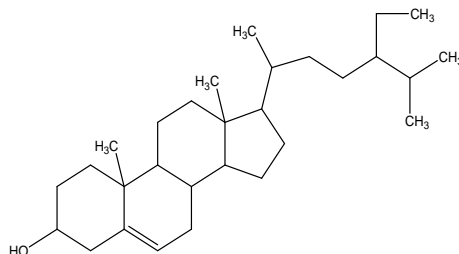


Figure 60. Structure chimique du β -Sitostérol

Le spectre de masse en mode négatif du composé numéro **10** a montré un pic de base $[M-H]^-$ m/z 447 et un ion aglycone à m/z 285. La perte de 162 unités de masse atomique (uma) de l'ion intermédiaire est due à la perte de glucose. La λ max du spectre UV à 253, 268 et 345 nm suggère qu'il s'agit de la **lutéoline 7-O-glucoside**. De plus, la présence des fragments à m/z 257, 243, 213 et 199 confirme cette identification (voir figure 61 et 62).

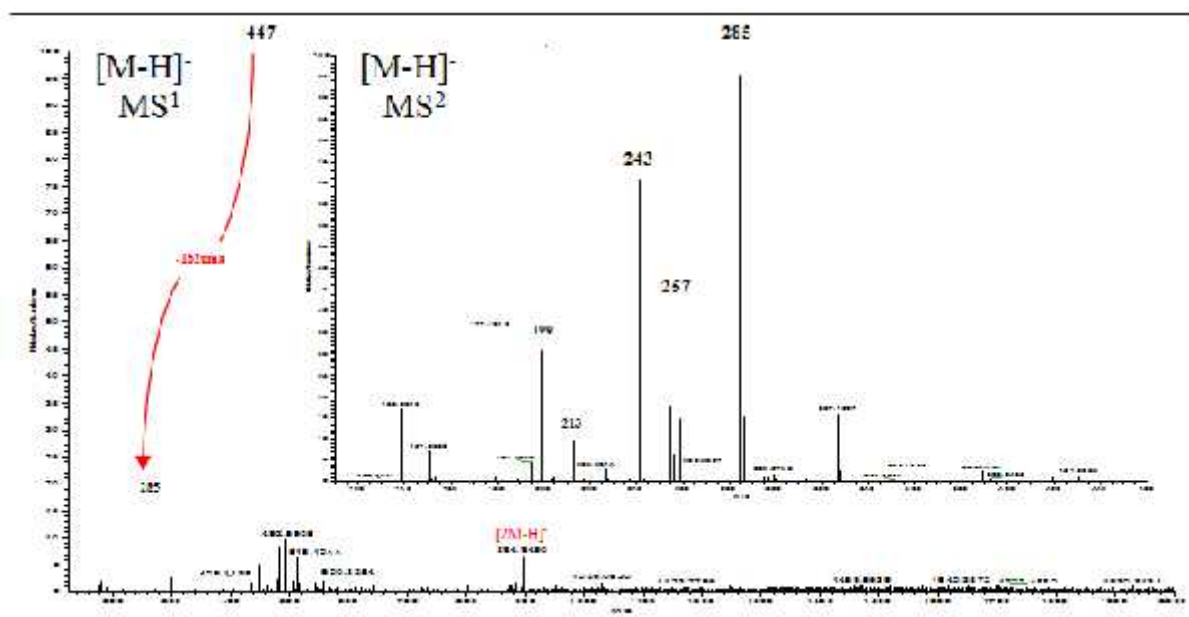


Figure 61. Spectre de masse $[M-H]^-$ en MS¹ et MS² du composé **10** à m/z 447

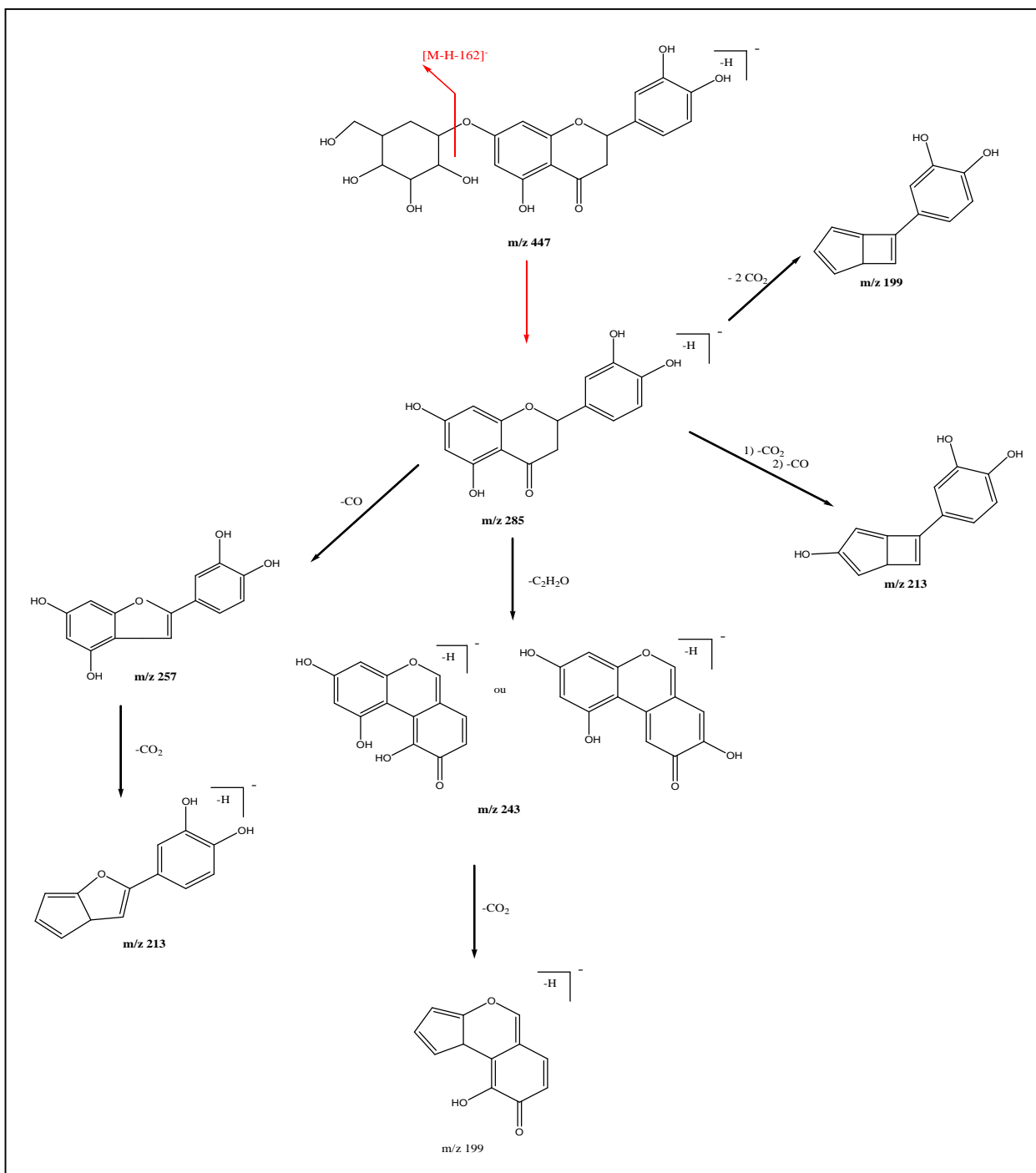


Figure 62. Mécanisme proposé pour la fragmentation du composé 10 (m/z 447)

Le composé **11** avec un ion $[M-H]^-$ à m/z 447 correspond au pic de base dans le spectre en mode négatif (figure 62). Dans MS2, le fragment d'ions à m/z 301 $[MH-146]^-$ indique que c'est un rhamnoside avec une liaison O-glycosidique. Le spectre UV avec des maxima à 256 et 352 nm pointe vers un flavanol de quercétine (Michel, 2011). D'autres pics ont été observés dans le même spectre à m/z 283, 257, 229, 179 et 151. La perte d'une molécule d'eau a donné un ion à m/z 283. La retro-cyclisation de l'ion m/z 301 a généré un ion

à m/z 179, qui a perdu une molécule de monoxyde de carbone (CO) pour donner l'ion à m/z 151. En outre, l'ion à m/z 301 perd 28 uma et génère un ion à m/z 257 (figure 63). D'après ces données, on peut suggérer que ce composé est **la quercétine 3-O-rhamnoside** (quercetrin).

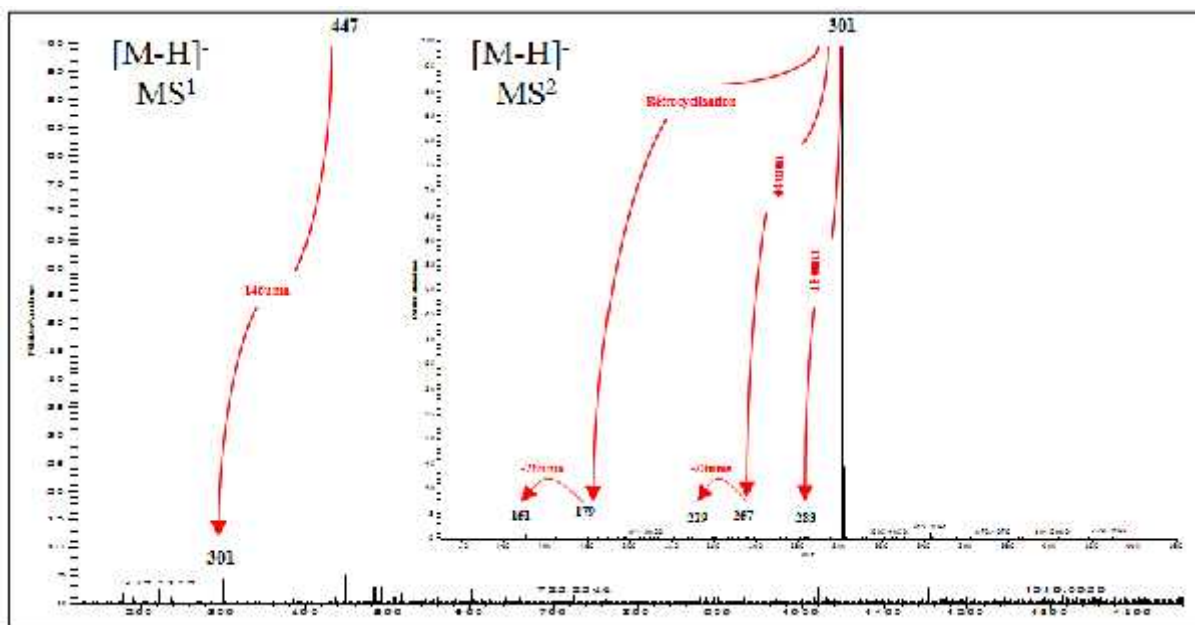


Figure 63. Spectre de masse [M-H]⁻ en MS¹ et MS² du composé 11 à m/z 447

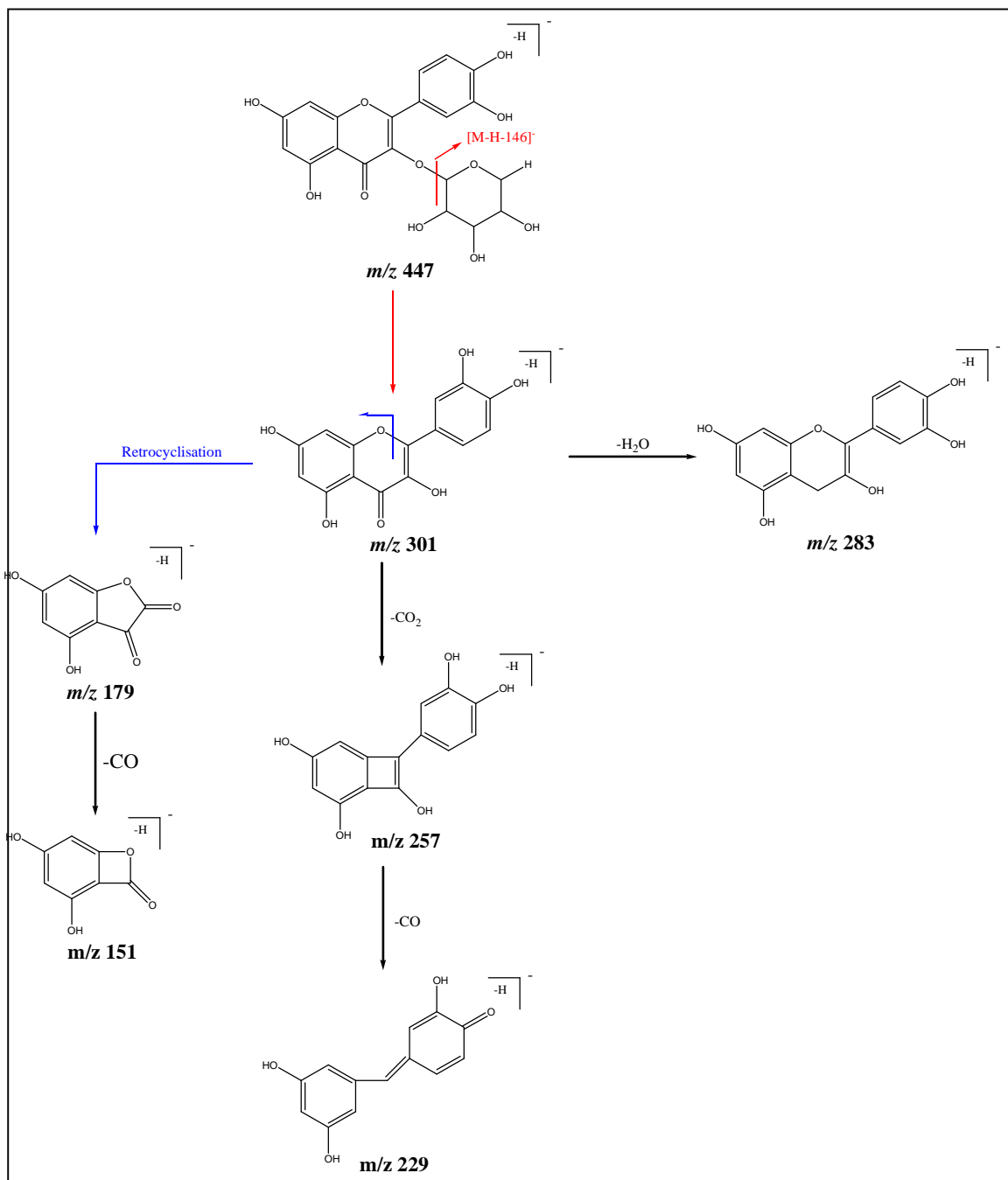


Figure 64. Mécanisme proposé pour la fragmentation du composé **11** (m/z 447)

Le composé numéro **12** a montré un ion $[M-H]^-$ m/z 451 et un ion aglycone à m/z 289 dans MS2 (figure 65). En outre, le spectre MS2 donne des fragments à m/z 179, 165 et 137. D'après Chua *et al.* (2008), la catéchine (m/z 289) a été détectée dans le mode négatif et avec un pic de faible intensité m/z 137 $[MH-152]^-$ résultant d'une retro-cyclisation de type Retro Diels-Alder (RDA). La perte de 3, 4 dihydroxy-phényle et de catéchol génère des fragments à m/z 165 et m/z 179, respectivement (figure 66). Ceci suggère que le composé **12** avec un spectre d'UV maximum à 278 est le **catéchine-7-O-glucoside**.

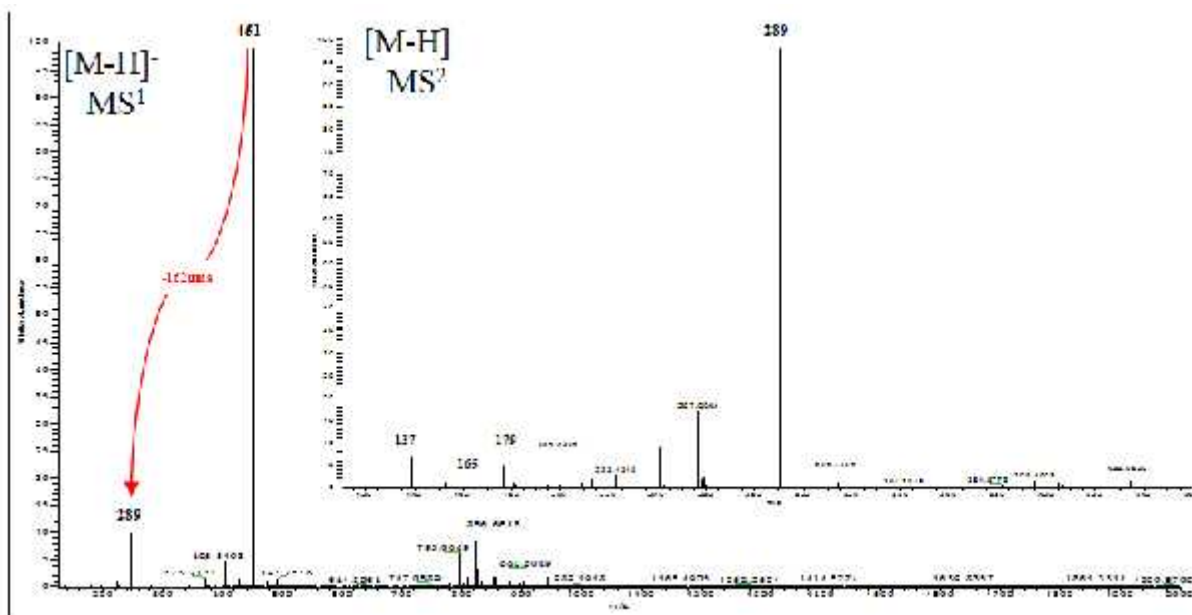


Figure 65. Spectre de masse [M-H]⁻ en MS¹ et MS² du composé 12 à m/z 451

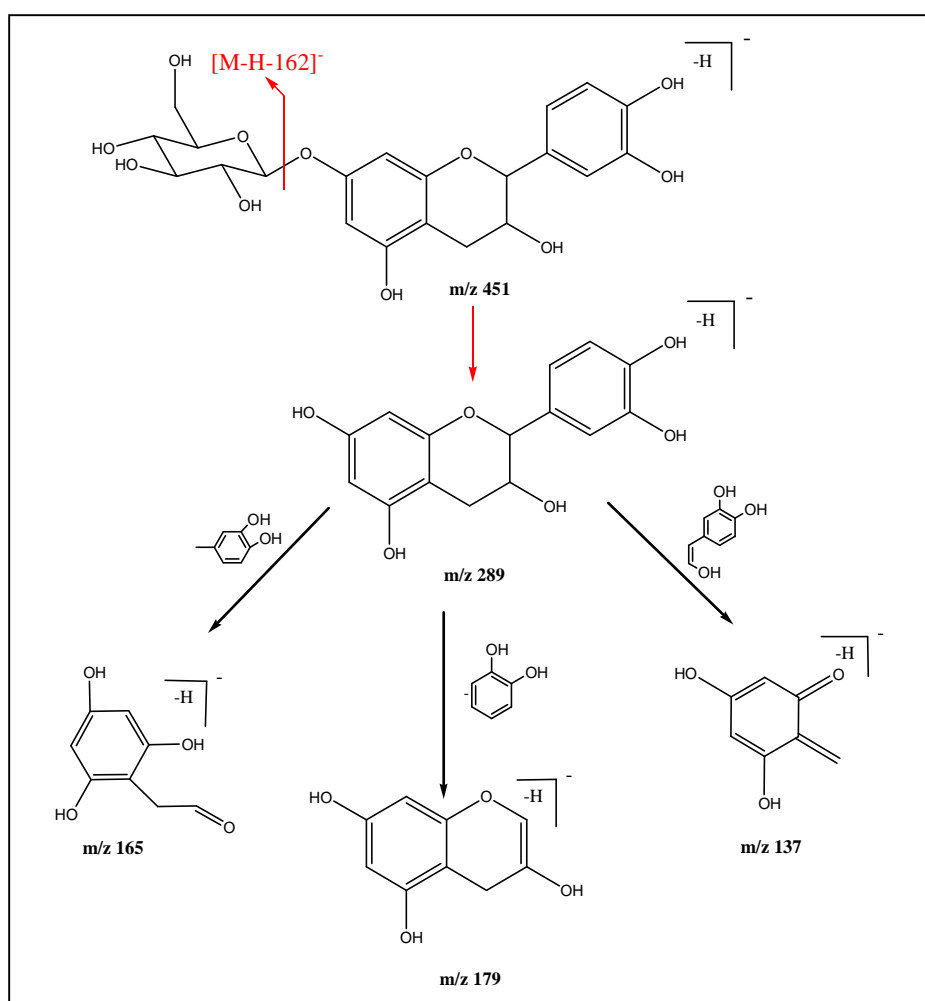


Figure 66. Mécanisme proposé pour la fragmentation du composé 12 (m/z 451)

Le spectre de masse du composé **14** montre un monopic MS1 dans le mode négatif à m/z 431 (figure 67). Le spectre MS2 a également montré un pic à m/z 413, correspondant à la perte d'une molécule d'eau (H_2O) et une autre à m/z 862 correspondant à $[2M-H]^-$. Le spectre MS2 présente un pic à m/z 311 obtenu par la perte de 120 uma (C-glycoside) et un autre correspondant à la perte d'un hexosyle (162 uma) à m/z 269 (figure 68). Le pic de l'ion à m/z 269 a été fragmenté en un pic à m/z 251 (perte de 18 uma) et un autre à m/z 207 (perte de 44 uma). Ces données ainsi que le spectre UV max permettent de supposer que le composé **14** est la **vitexine (apigénine 8-C-glycoside)**.

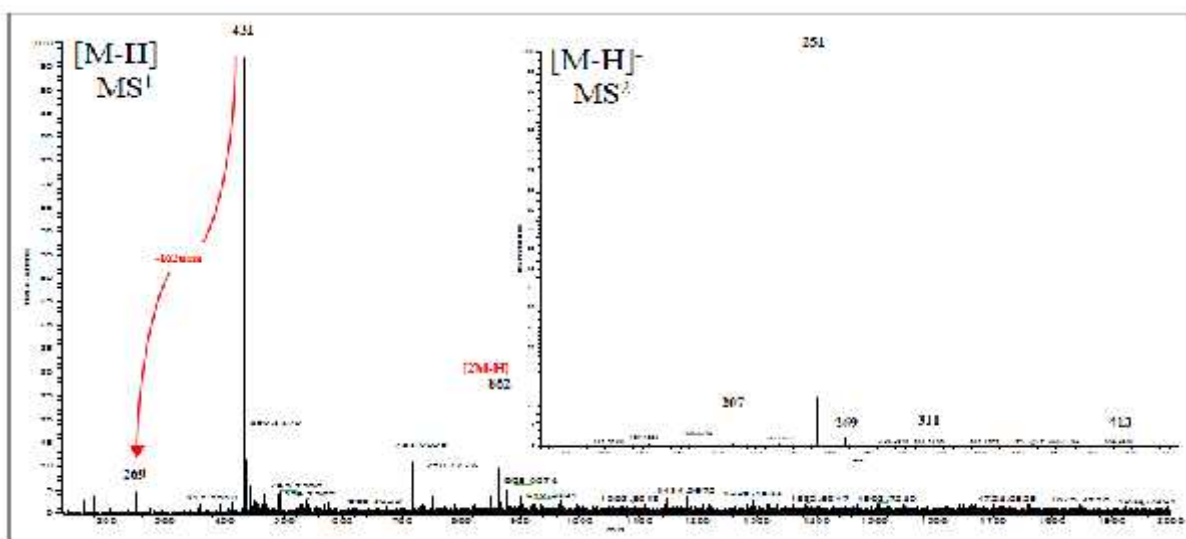


Figure 67. Spectre de masse $[M-H]^-$ en MS¹ et MS² du composé 14 m/z 431

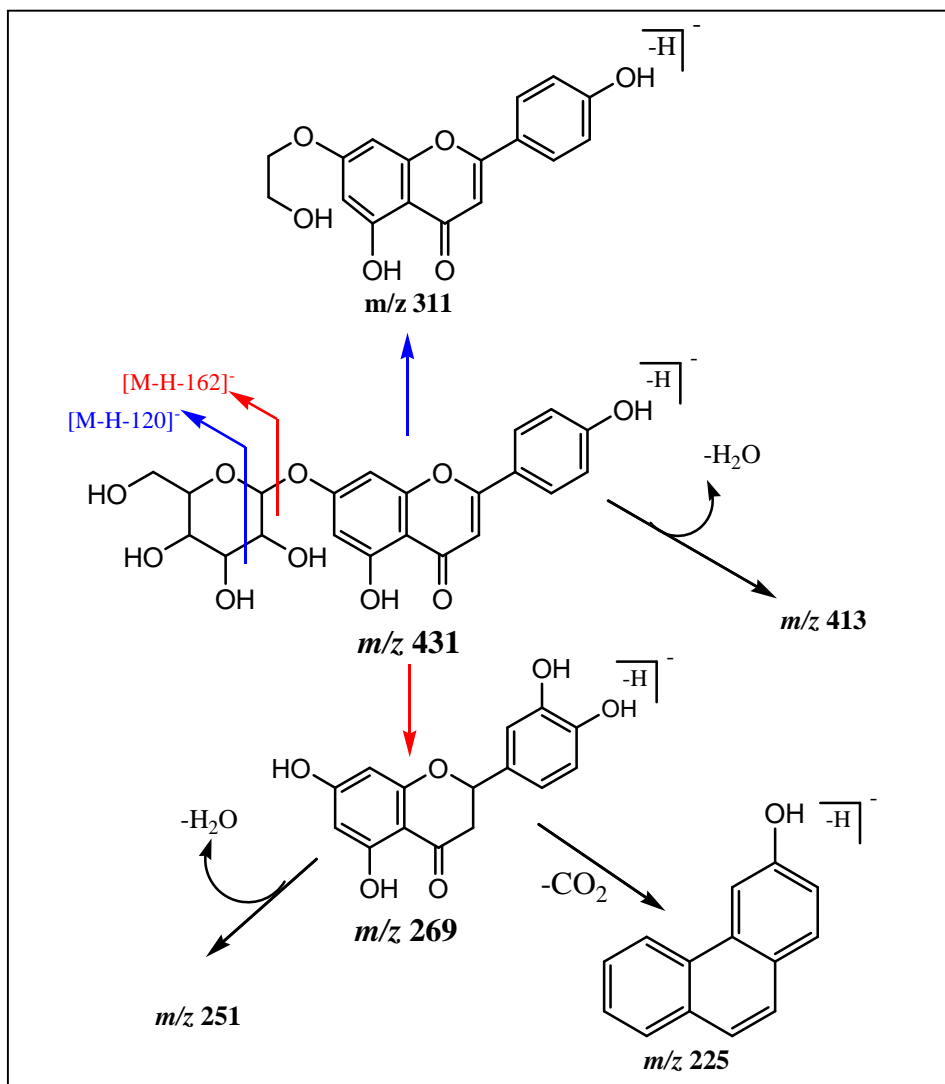


Figure 68. Mécanisme proposé pour la fragmentation du composé 14 (m/z 431)

Le composé numéro **15** a un spectre de masse identique à celui rapporté pour la vitexine avec la présence d'un ion intense m/z 431 et plusieurs fragments (m/z 311, 269 et 207), ce qui suggère qu'il pourrait être identifié comme l'**isovetexin** (figure 69).

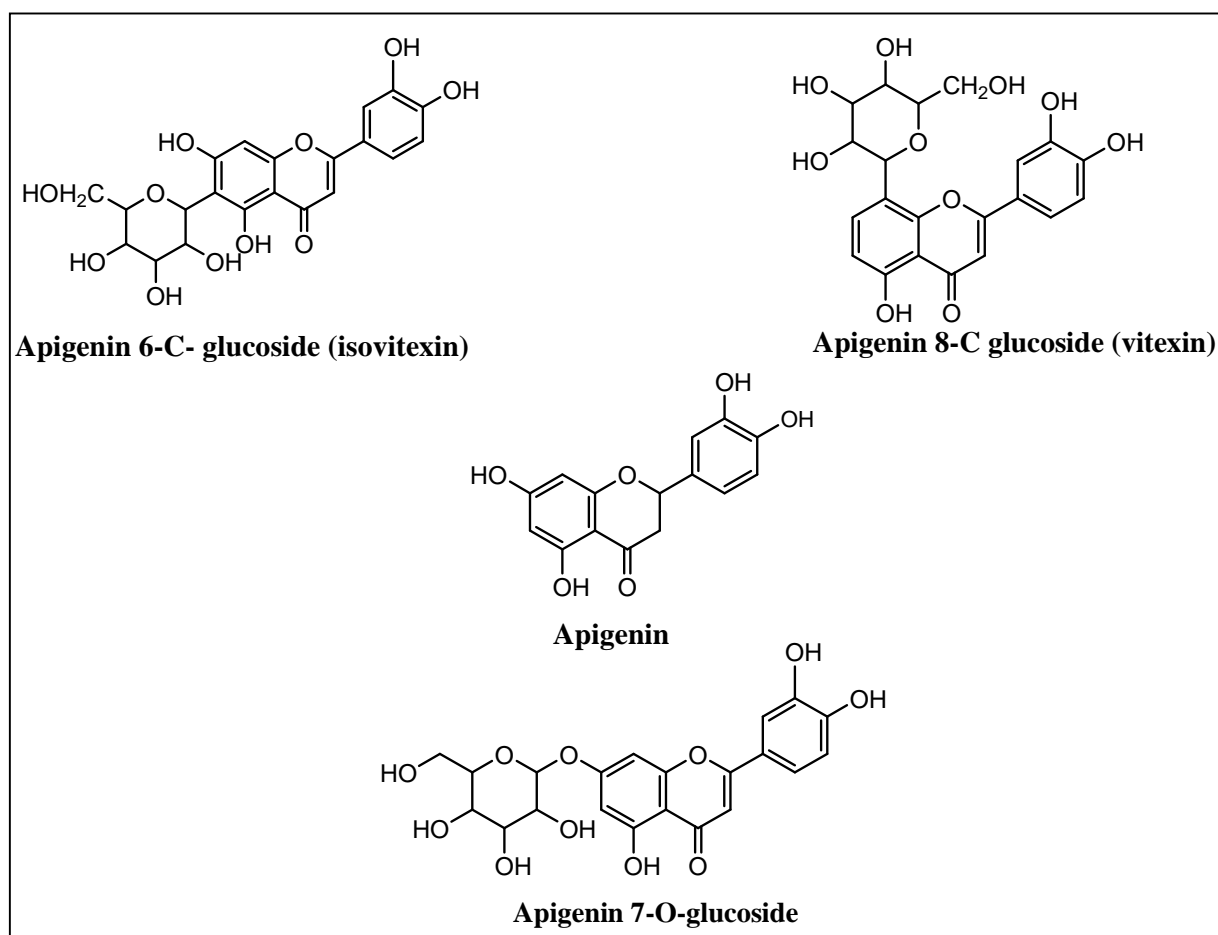


Figure 69. Structures des différentes formes d'isomères de l'apigénine glucoside

Le composé numéro **17** enregistre la présence d'un ion intense $[M + H]^+$ m/z 181 (figure 70) et les fragments m/z 163 et 137 due à la perte de 18 uma $[M + H - H_2O]^+$ et 44 uma $[M + H - CO_2]^+$, ce qui suggère qu'il pourrait être **l'acide caféique** (figure 70).

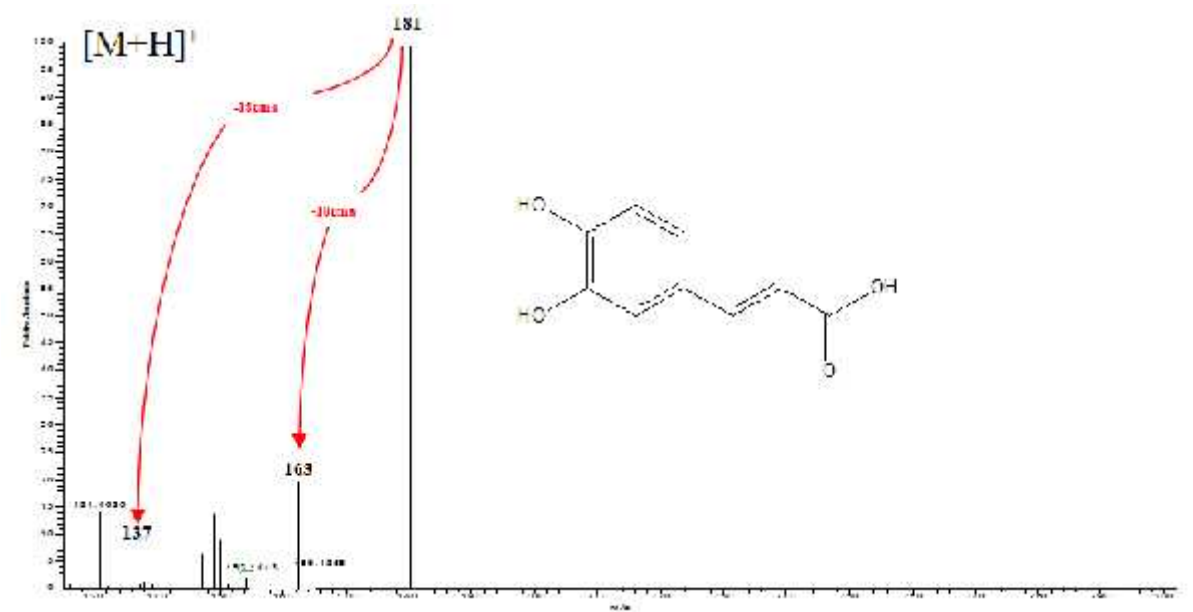


Figure 70. Spectre de masse $[M+H]^+$ du composé 17 à m/z 181

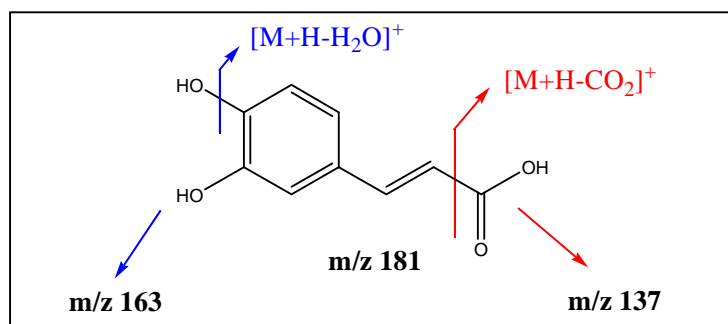


Figure 71. Schéma proposé pour la fragmentation du composé 17 (m/z 181)

1.5.2. Résultats de l'analyse par LC MS/MS pour l'extrait éthanolique d'*Urtica dioica*

Le chromatogramme de la figure 72 représente le profil de l'extrait éthanolique de l'ortie en modes positif et négatif. Au total, treize (13) pics ont été décelés ce qui donne treize (13) composés identifiés. Pour chacun des pics chromatographiques, les temps de rétention, les UV, la formule chimique, les masses et les fragments en mode négatif ou positif sont mentionnés dans le tableau 11. Nous citons ci-dessous les démarches d'identification pour chacun des composés retrouvés dans cet extrait éthanolique de l'ortie.

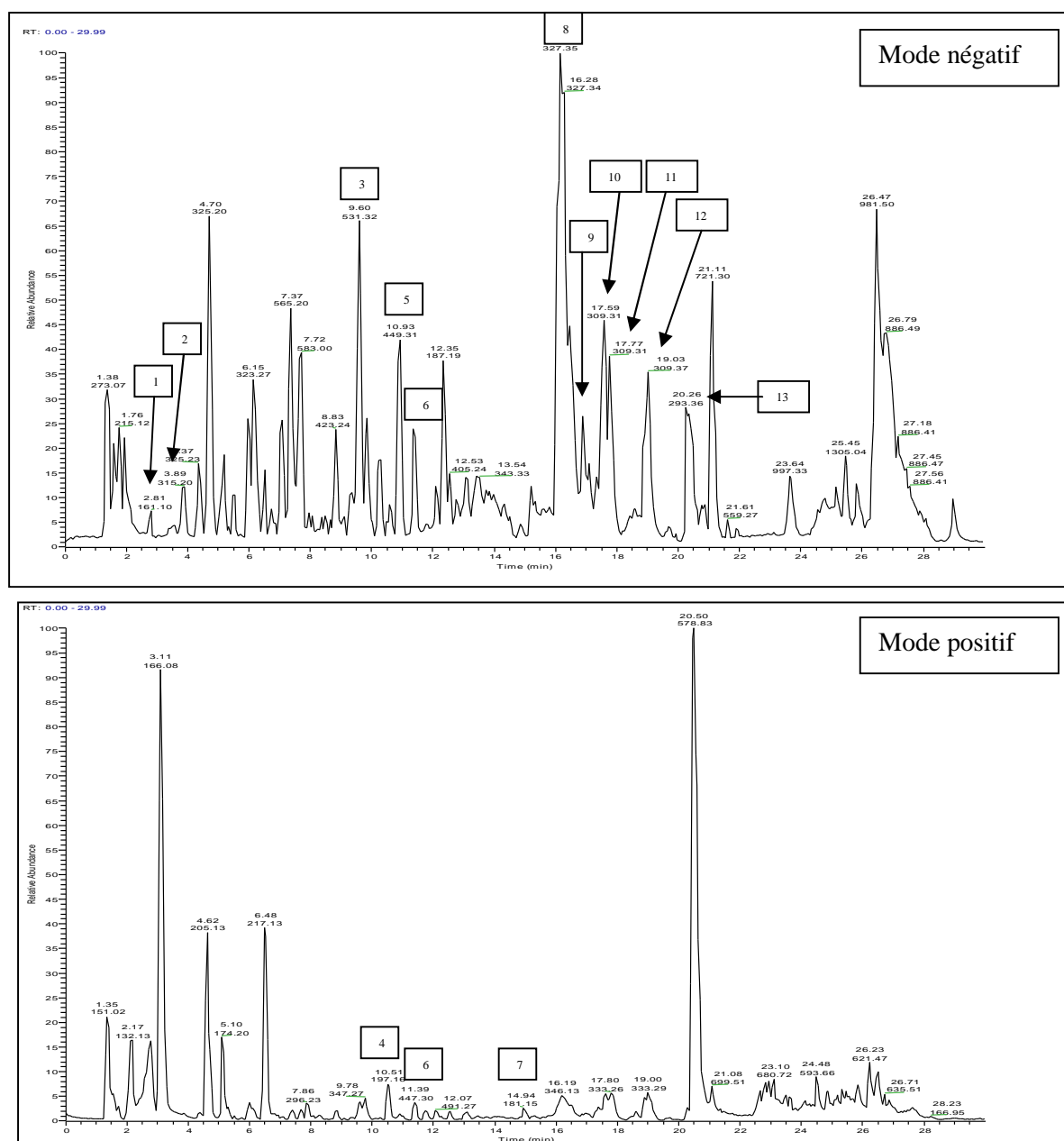


Figure 72. Profils des chromatogrammes dans les modes positif et négatif de l'extrait d'éthanol d'*Urtica dioica* obtenus par LC MS/MS.

Tableau XI. Composés identifiés par LC MS/MS dans l'extrait d'éthanol d'*Urtica dioica*

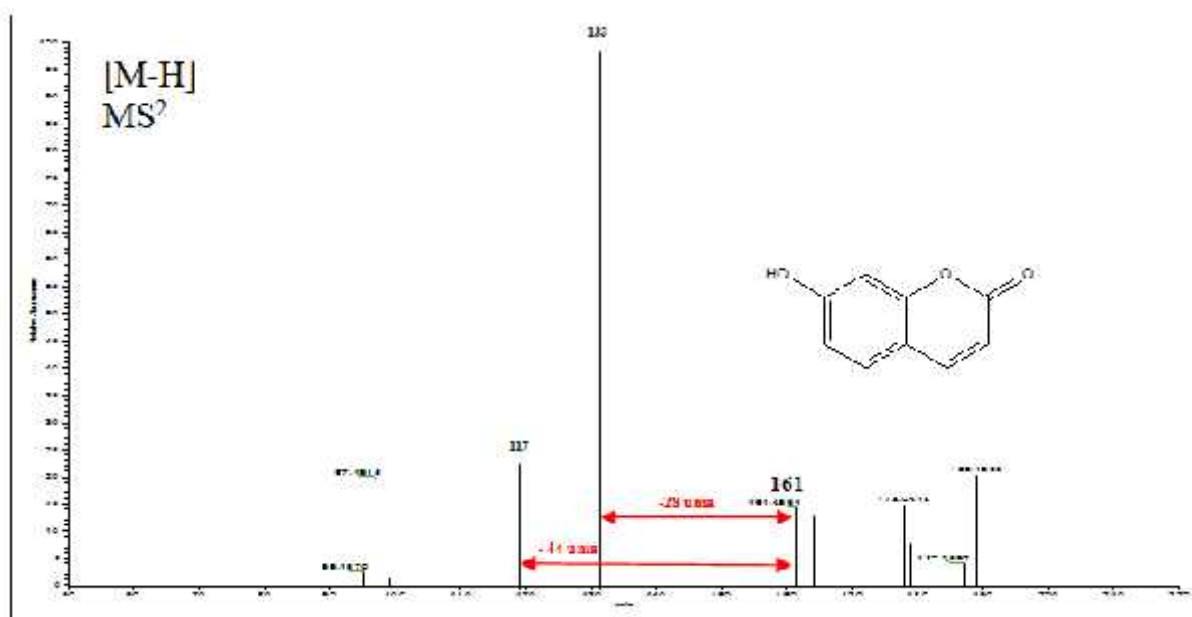
N° Pic	RT	UV (nm)	Formule chimique	[M-H] ⁻ /[M+H] ⁺	MS/ MS	Tentative d'identification
1	2,81	320	C ₉ H ₆ O ₃	161	133, 117	Ombelliférone
2	3,89	254, 354	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315	225	Isorhamnétine
3	9,60	Nd	C ₂₅ H ₃₉ O ₁₂	531	225, 369, 387	Hexenyl primeveroside
4	10,51	280	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	/197	179, 153, 138, 137, 125, 121	Acide dihydroferulique
5	10,93	281	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₁	449	405, 287, 269, 241, 225, 213, 197, 169, 151	Eriodictyol O-glucoside
6	11,39	276, 316	<u>C₂₁H₁₈O₁₁</u>	445/447	-	Baicaline
7	14,94	322	C ₉ H ₈ O ₄	/181	178, 134	Acide caféique
8	16,17	Nd	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	327	229	Pinène-ol-O-glucoside
9	16,41	Nd	C ₁₂ H ₁₉ O ₄	227	165, 183	Acide dodecanedioïque
10	17,59	323	C ₁₄ H ₁₃ O ₈	309	-	Féruloyl malate
11	17,77	Nd	C ₁₈ H ₂₉ O ₄	309	-	Acide dihydroxy-octadecatrienoïque
12	19,03	Nd	C ₁₈ H ₂₉ O ₄	309	-	Acide japonique
13	20,26	Nd	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	293	-	Acide 9-hydroxy-octadecatrienoïque

nd: non défini ; RT : Temps de rétention

DEMARCHE D'IDENTIFICATION DES COMPOSES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE D'*Urtica dioica*

Dans cette section, nous donnons les détails de l'identification de chacun des treize composés de l'extrait éthanolique de l'ortie. Il s'agit des composés résumés dans le tableau 11 et la figure 72.

En fait, d'après le temps de rétention et l'ion $[M - H]^-$ à m/z 161, le composé **1** peut être identifié comme étant l'**ombéliférone** (figure 73). De plus, la fragmentation confirme l'identification, où les ions à m/z 133 et m/z 117 correspondent à la perte d'une molécule CO (28 uma) et CO₂ (44uma), respectivement. Cette identification est en agrément avec celle de Wang et Feng (2009).



Le composé **2** a été identifié comme étant l'**isorhamnétine** et ceci est dû à la présence d'un pic de base à m/z 315 $[M - H]^-$ (figure 74). De plus, la présence du fragment caractéristique m/z 300 confirme l'identification qui est en accord avec celle de Santos et *al.*, (2011). Le fragment m/z 300 est dû à la perte du radical $\bullet\text{CH}_3$ (Fabre et *al.*, 2001) (figure 75).

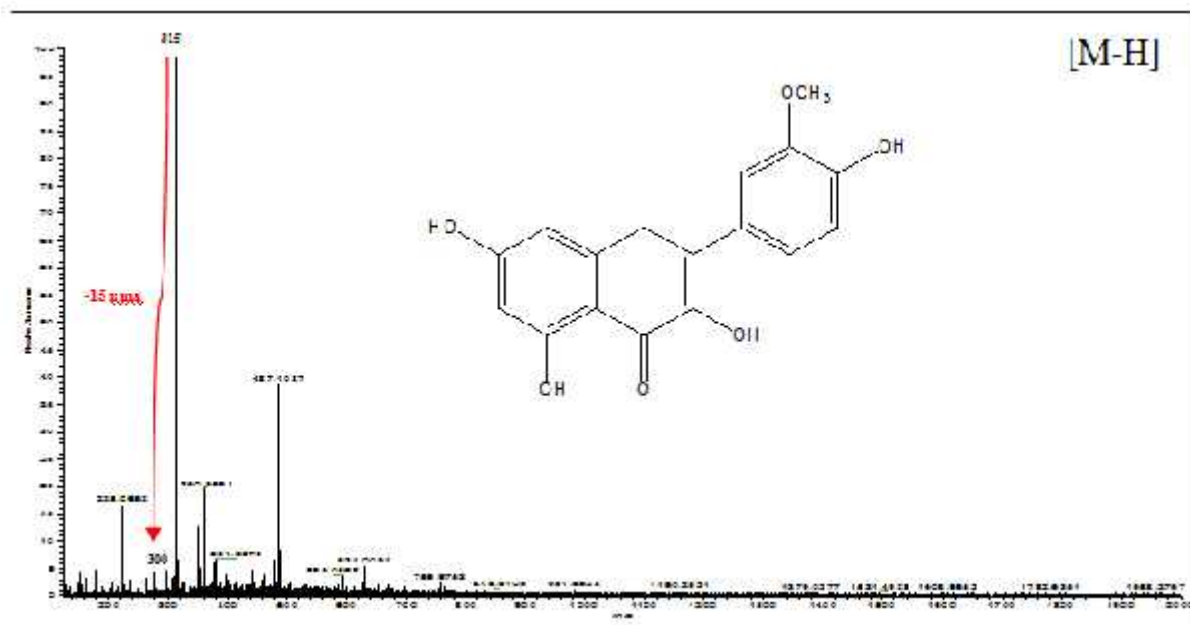


Figure 74. Spectre de masse [M-H]⁻ du composé 2 à m/z 315

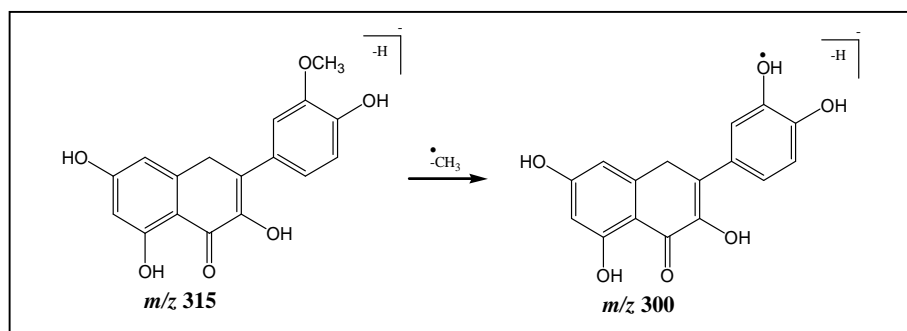


Figure 75. Mécanisme proposé pour la fragmentation du composé 2 à m/z 315

En mode négatif, le composé **3** montre un ion à m/z 531 et des fragments à m/z 387, 225 et 207 (figure 76), ce qui permettra d'identifier ce composé comme étant **Hexenyl-primeveroside** (Farag et al., 2013).

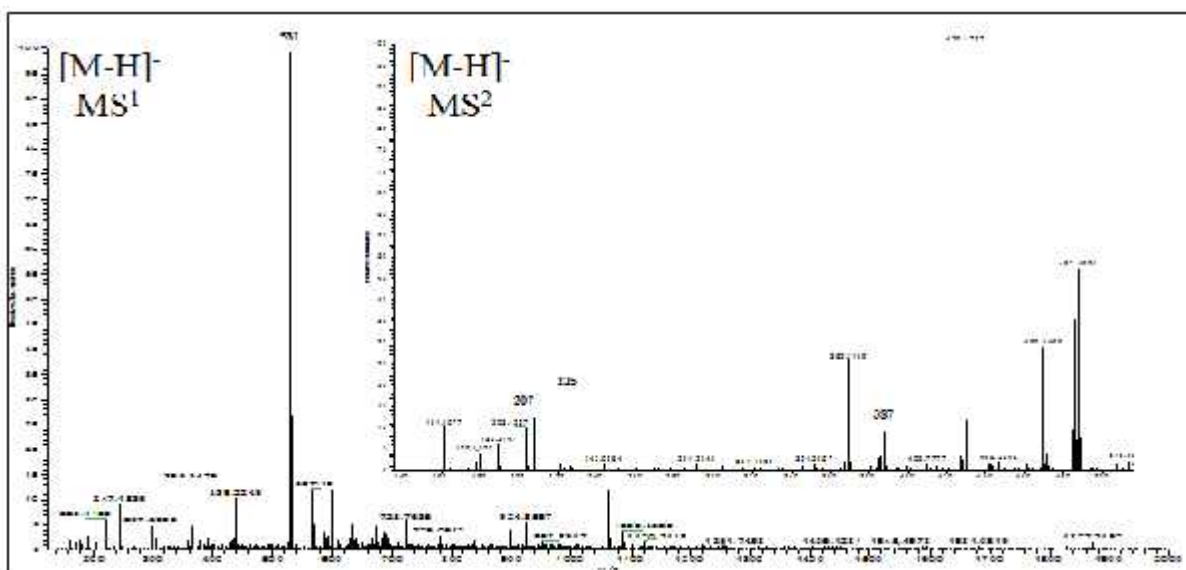


Figure 76. Spectre de masse en MS¹ et MS² du composé 3 m/z 531

Le composé **5** avec un ion [M-H]⁻ à m/z 449 correspond au pic de base dans le spectre en mode négatif et le fragment m/z 405 à la perte d'une molécule CO₂. Dans le spectre MS², le fragment d'ion à m/z 287 [MH-162]⁻ indique que c'est un glucoside. D'autres pics ont été observés dans le même spectre à m/z 269, 241, 225, 213, 197, 169 et 151 (figure 77 et 78). D'après ces données, nous pouvons suggérer que ce composé est l'**ériodictyol O-glucoside**.

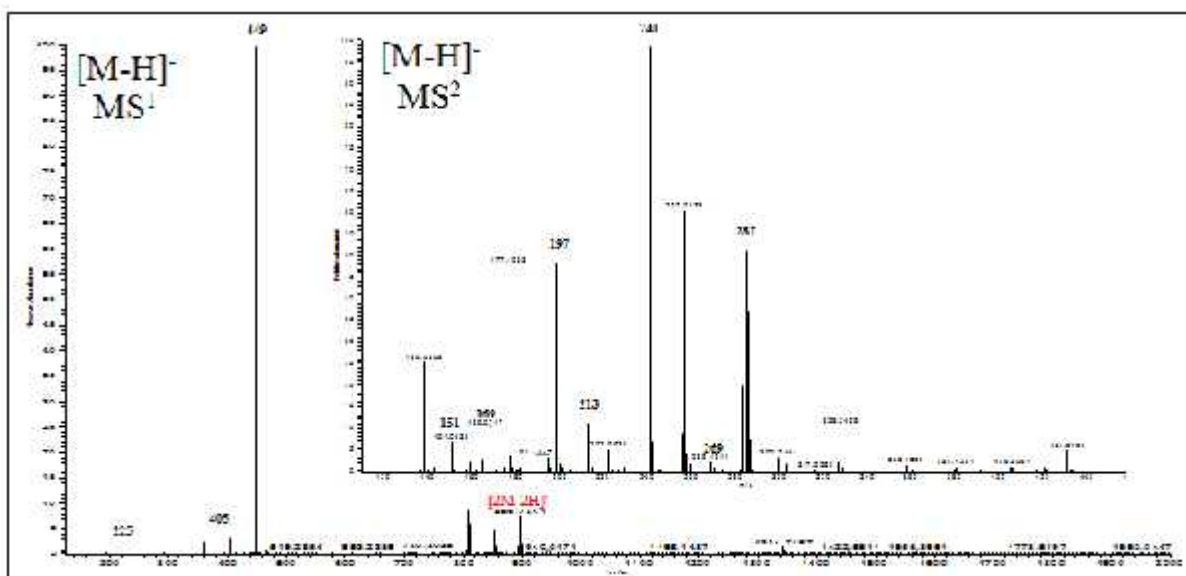


Figure 77. Spectre de masse en MS¹ et MS² du composé 5 à m/z 449

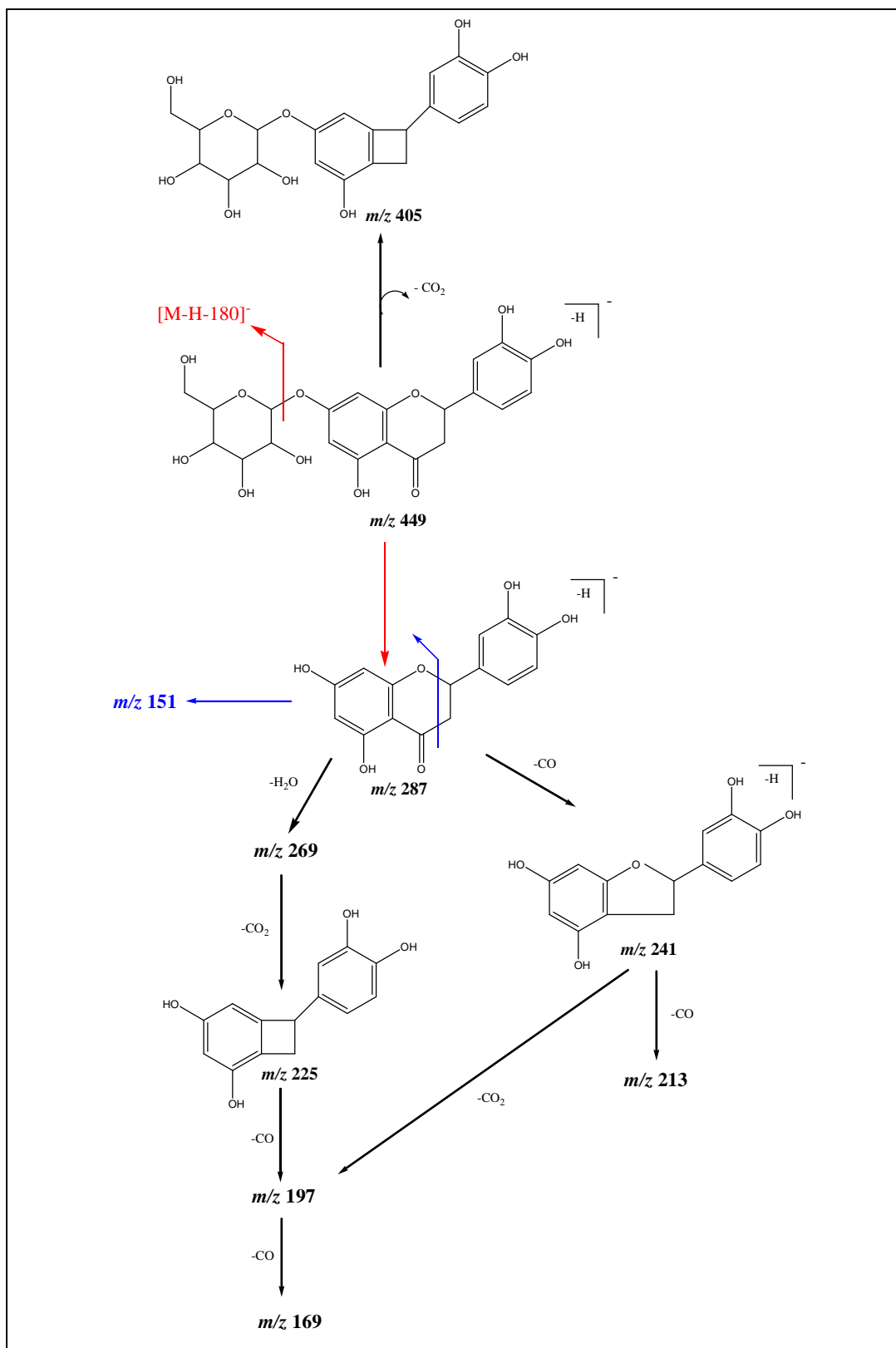


Figure 78. Mécanisme proposé pour la fragmentation du composé 5 à m/z 449

Le spectre UV du composé **6** montre une absorption maximum à 276 et 316 nm et le spectre de masse un ion à m/z 445 dans le mode négatif et à m/z 447 dans le mode positif. Ce qui suggère que c'est la **baicaline** (baicaléine 7-O-glucuronide) (figure 79) (Yang et al., 2011).

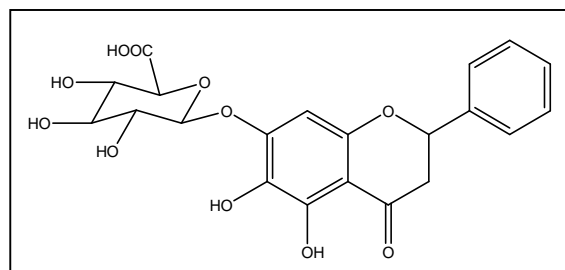


Figure 79. Structure de la baicaline

L'identification du composé **8** a été orientée vers le **pinene-ol-O-glucoside** vu l'ion de base détecté à $[M-H]^-$ à m/z 327 et le fragment à m/z 229 (voire figure 80). Cette identification est en accord avec les travaux de Farag et al. (2013).

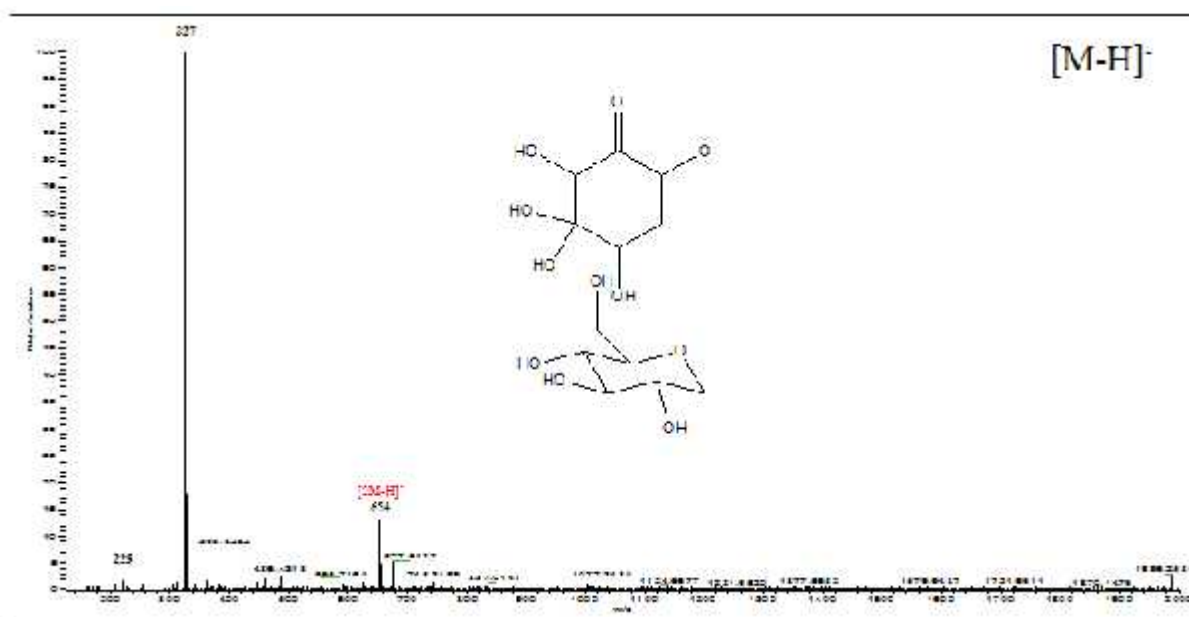


Figure 80. Spectre de masse du composé 8 à m/z 327

D'après la figure 81, le composé **9** avec un ion $[M-H]^-$ à m/z 227 et des fragments à m/z 183 et m/z 165 (Farag et al., 2013) correspondant à la perte d'une molécule de CO_2 et par la suite d'une molécule d' H_2O , peut être identifié comme étant l'**acide dodecanoïque**.

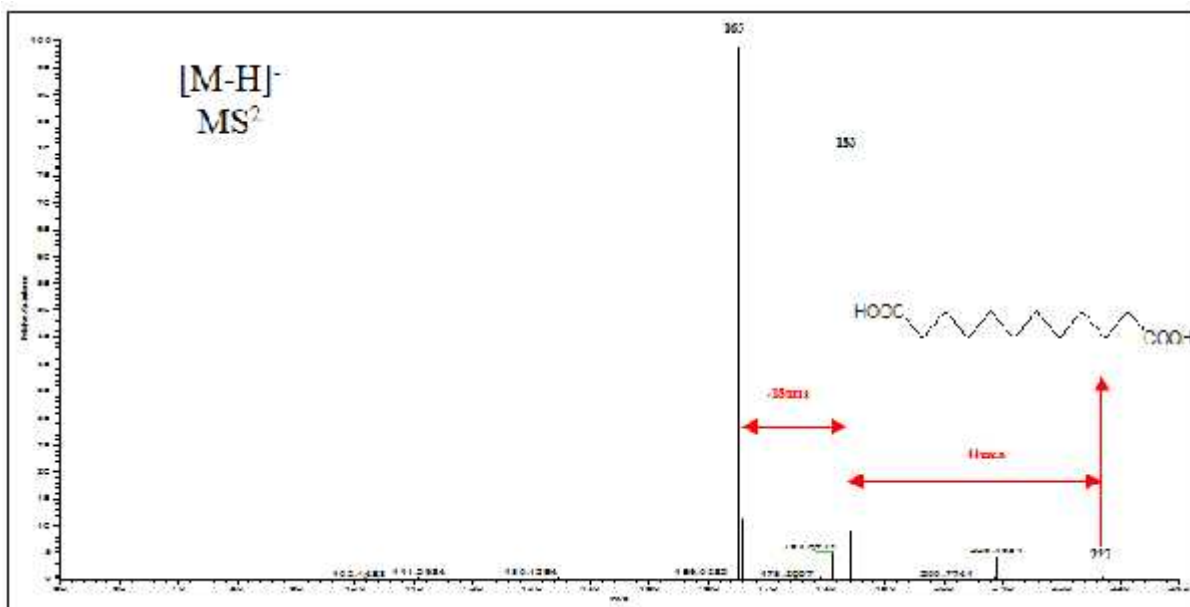


Figure 81. Spectre de masse MS² du composé 9 à m/z 227

Le temps de rétention, le spectre UV et l'ion [M-H]⁻ détecté à m/z 309 permettent d'identifier le composé **10** comme étant le **féruloyl malate**, et ceci est en accord avec les résultats de Lake *et al.* (2009).

Deux autres pics avec un ion [M-H]⁻ à m/z 309 peuvent être observés. L'absorption UV n'a pas été définie mais d'après la littérature (Farag *et al.*, 2013), nous pouvons suggérer que les composés **11** et **12** correspondent à l'**acide dihydroxy octadecatriénoïque** et l'**acide japonais**, respectivement. De même, nous pouvons supposer que le composé **13** avec un ion à m/z 293 est l'**acide 9-hydroxy octadecatriénoïque**.

En fin, d'après l'absorption UV et les ions [M + H]⁺ détectés à m/z 197 et m/z 181, les composés **4** et **7** ont été identifiés comme étant l'**acide dihydroférulique** et l'**acide caféique** (dont les structures sont montrées dans l'annexe 3).

Discussion

Le criblage phytochimique mené par LC MS/MS indique que les acides phénoliques et les flavonoïdes ainsi que leurs dérivés respectifs représentent des familles majoritaires dans les deux plantes étudiées.

Comme le montre le tableau 9, cette investigation a conduit à l'identification de onze **acides phénoliques** et/ou leurs dérivés. Parmi lesquels six (acide m-geranyl-p hydroxybenzoïque, acide p-hydroxyphényl lactique, acide dihydrofêrulique, acide 3,4-diméthoxycinnamique, coumaroyl hydroxyagmatine, acide 4-hydroxybenzoïque glucoside) ont été retrouvés au niveau de l'extrait aqueux de la bourache, six (acide m-geranyl-p hydroxybenzoïque, acide caféique, acide sinapique hexoside, acide lithospermique B, acide caféoyl shikimate, acide 4-hydroxybenzoïque glucoside) au niveau de l'extrait éthanolique de la bourache et trois seulement (fêruloïl malate, acide caféique, acide dihydrofêrulique) au niveau de l'extrait éthanolique de l'ortie.

Parmi les acides phénoliques identifiés dans la bourache, l'acide caféique, le p-hydroxyphényl lactique et l'acide p-hydroxybenzoïque ont été signalés par Zadernowska et *al.* (2002) dans un extrait méthanolique des graines de cette plante. Par la suite, Mhamdi et *al.* (2010a) ont identifié d'autres composés phénoliques dans l'extrait méthanolique des feuilles de bourache tunisienne. Ces auteurs ont montré la présence de l'acide fêrulique, l'acide cinnamique, l'acide syringique, l'acide sinapique et l'acide coumarique. Ce qui est en accord avec la présence de ces dérivés d'acides phénoliques dans nos extraits.

Nous avons également mis en évidence, treize **flavonoïdes** et/ou leurs dérivés. Parmi lesquels, trois (lutéoline 7,3',4'-triméthyle éther, kaempférol 3,7,4'- triméthyle éther, naringénine O-hexosides) se retrouvent au niveau de l'extrait aqueux de la bourache, sept (la quercetrin, l'isoquercétine, la catéchine-7-O-glucoside, la naringénine O-hexoside, la lutéoline 7-O-glucoside, la vitexine et l'isovitexine) au niveau de l'extrait éthanolique de la bourache et quatre (isorhamnétine, eriodictyol O-glucoside, baicaline, Acide japonais) au niveau de l'extrait éthanolique de l'ortie.

Tous les flavonoïdes ainsi que l'acide lithospermique ont été identifiés pour la première fois dans les feuilles de *Borago officinalis*, bien que déjà rapporté dans la famille des Boraginacées (Wollenwebera et *al.*, 2002 ; Yamamoto et *al.*, 2002).

Nos investigations ont aussi conduit à l'identification de trois **acides gras** (acide dodecanedioïque, acide dihydroxy-octadécatrienoïque, acide 9-hydroxy-octadécatrienoïque),

un **mono-terpène glucoside** (Pinène-ol-*O*-glucoside) et une **coumarine** (ombelliférone), tous au niveau de l'extrait éthanolique de l'ortie. Tous ces composés identifiés dans l'extrait d'ortie ont été préalablement rapportés par divers travaux (Farag et *al.*, 2013 ; Orcic et *al.*, 2014 ; Proestos et *al.*, 2006).

Un **aldéhyde phénolique** (syringaldéhyde) a été retrouvé au niveau de la bourache, aussi bien dans son extrait aqueux que dans son extrait éthanolique. Ce dernier contient également un **stérol** (β -Sitostérol). L'identification du β -sitostérol dans l'extrait éthanolique est en conformité avec les résultats de Conforti et *al.* (2008).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence un **séco-iridoïde** au niveau de l'extrait aqueux de la bourache. Il s'agit de l'oleuropéine qui est connue pour sa présence dans des feuilles d'olivier (Jemai et *al.*, 2008). Nous la signalons donc pour la première fois dans la bourache.

On note l'existence de dérivés osidiques d'avantage dans les extraits éthanoliques. A cet effet, nous rappelons que dans le système d'extraction, l'addition de 20% d'eau a eu comme effet d'améliorer l'extraction de ces molécules à forte teneur en groupement OH.

De plus, nous avons constaté dans la précédente partie qu'il y avait une différence entre les deux extraits de la bourache en ce qui concerne la capacité antioxydante. Ce qui est en parfait accord avec les résultats d'identification par LCMS. L'extrait éthanolique contenant autant d'acides phénoliques mais bien plus de flavonoïdes a eu une répercussion sur la capacité antioxydante qui se retrouve plus élevée dans l'extrait éthanolique par rapport à l'extrait aqueux (tableaux 7,8 et 9).

Cette variabilité quantitative et qualitative en composés polyphénoliques est à l'origine des capacités antioxydantes différentielles de nos extraits végétaux. En effet, dans nos précédents résultats (dosages spectrophotométriques), nous rapportons que l'extrait éthanolique de la bourache possède une capacité antioxydante plus importante que l'extrait éthanolique de l'ortie (pour le test DPPH, NBT et l'activité antioxydante totale). Ce qui est en parfait accord avec l'identification par LC MS qui a révélé plus de composés bioactifs dans le premier extrait par rapport au second : avec sept flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de la bourache versus quatre pour l'extrait éthanolique de l'ortie et de même six acides phénoliques dans le premier extrait versus trois dans le second extrait.

Néanmoins, dans son ensemble cette activité antioxydante nous a semblé élevée dans les extraits alcooliques par rapport aux extraits aqueux (tableaux 6, 7 et 9), en accord avec la teneur en polyphénols qui est plus élevée pour les deux extraits éthanoliques (figure 35).

En effet, plusieurs études ont affirmé qu'il existe une étroite relation entre la capacité antioxydante et la structure des composés phénoliques (Heim et *al.*, 2002 ; Apak et *al.*, 2008 ; Soobrattee et *al.*, 2005).

Ainsi par exemple, la capacité antioxydante des acides phénoliques, des flavonoïdes et leurs dérivés dépend du nombre de groupement hydroxy présents dans la molécule (Soobrattee et *al.*, 2005 ; Apak et *al.*, 2008).

Tout comme la capacité à piéger des radicaux libres est due principalement à la forte réactivité de ces groupements, et donc, la présence de glucosides et de O-méthylation diminue la capacité antioxydante (Heim et *al.*, 2002).

Dans l'extrait éthanolique de bourrache, ayant la plus forte capacité antioxydante (voir tableau 7), sept flavonoïdes ont été identifiés, parmi lesquels l'isoquercétine et l'isovitexin remplissent les deux premiers critères (la structure ortho-dihydroxyle sur le cycle B et la présence de la double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo), la lutéoline 7-O-glucoside le premier, la quercetrin et la vitexine le deuxième et enfin la catéchine -7-O-glucoside possède le groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃, qui est le troisième critère (voir chapitre III).

En outre, une forte capacité antioxydante a été également rapportée pour les composés 6 (Damašius et *al.*, 2014), 9 (Conforti et *al.*, 2008) et 17 (Gülçin, 2006) identifiés dans cet extrait.

Les trois flavonoïdes de l'extrait éthanolique d'ortie, l'ériodictyol O-glucoside, la baicaline et l'isorhamnétine remplissent, respectivement, les critères : un, deux et trois. De plus, les composés 1 et 7 identifiés dans cet extrait (tableau 11) sont aussi dotés de pouvoir antioxydant selon plusieurs auteurs (Gülçin, 2006 ; Ramesh et Pugalendi, 2006).

Quant à l'extrait aqueux de bourrache, il contient des flavonoïdes O-méthylé (lutéoline 7, 3', 4'-triméthyléther, kaempférol 3,7,4'-triméthyléther). Heim et *al.* (2002) ont rapporté que l'obstruction stérique du 3'-4' catéchol par l'O-méthylation compromet significativement la capacité antioxydante des flavonoïdes. D'autre part, plusieurs études affirment que l'oleuropéine est un puissant antioxydant (Jemai et *al.*, 2008).

Ainsi, il est possible de conclure que la capacité d'agir comme un donneur d'hydrogène et un inhibiteur de l'oxydation est due à la synergie entre les antioxydants, ce qui rend la capacité antioxydante dépendante, non seulement, de la concentration en polyphénols, mais aussi de leur structure et leur interaction (effet synergique) (Hmid et *al.*, 2013).

Par ailleurs, les polyphénols sont doués d'une multitude de propriétés suscitant depuis une dizaine d'année un intérêt croissant dans le domaine de la santé. Une des raisons

principales est la reconnaissance bien entendu de leurs propriétés antioxydantes mais aussi leur implication probable dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydant.

Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication en tant qu'immuno-modulateur, anti-inflammatoire, antiallergique (voir annexe 10) notamment dans la prévention des maladies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires ou l'ostéoporose (Rock, 2003).

C'est ainsi qu'au terme de cette identification par LCMS, révélant trente cinq molécules bioactives et en vu de la prévalence de l'asthme, en tant que maladie anti-inflammatoire, en Algérie et à Annaba plus particulièrement, nous avons jugé utile de tester, dans une dernière partie de notre présent travail, les effets de nos deux extraits de plantes, *in vivo*, dans un modèle d'asthme expérimental.

2. Les activités biologiques des deux plantes

Après le screening phytochimique et la mise en évidence des propriétés antioxydantes de nos différents extraits issus de *Borago officinalis* et *Urtica dioica*, nous avons testé leurs effets dans un modèle d'asthme expérimental. Pour cela, nous le rappelons : des rats wistar ont été sensibilisés avec un allergène (l'ovalbumine) et traités avec les extraits aqueux de nos deux plantes. Nous avons, par la suite, mesuré un certain nombre de paramètres (physio-hématologiques, histologiques et ceux du stress oxydant) puis nous avons réalisé des comparaisons entre les lots sensibilisés et/ou traités et les lots témoins.

VARIATIONS DES PARAMETRES PHYSIO-HEMATOLOGIQUES & HISTOLOGIQUES

2.1. Etude du poids corporel et du poids relatif des organes

Tout au long du protocole expérimental, les rats ont été pesés un jour sur deux. Ceci nous a permis de calculer l'évolution du poids corporel dans les différents lots. De plus, le jour du sacrifice, les poids des poumons et du foie ont été mesurés. Ceci nous a permis de calculer le poids relatif de ces organes ($\text{poids de l'organe} * 100 / \text{poids de l'animal}$) et d'en évaluer la variation entre les différents lots. Les résultats obtenus, concernant l'évolution du poids corporel et du poids relatif des organes, sont montrés dans le tableau 12.

2.1.1. La croissance corporelle

Nos résultats montrent des gains de 2,88% et 2,04% chez les rats traités avec nos deux plantes par rapport aux rats témoins et une diminution de 2,82% du poids corporel des rats du lot sensibilisé à l'OVA par rapport au lot témoin (tableau 12). Par contre, le poids corporel des rats appartenant aux lots O/BO et O/UD (c.-à-d. sensibilisés et traités avec les extraits de plantes) augmente de 1,63% et 4,21%, respectivement, par rapport au lot sensibilisé à l'OVA.

Tableau XII. Variations du poids corporel PC (g) et du poids relatif PR (g/100g de poids corporel) des organes (foie et poumons)

Paramètres (unité)	Lots expérimentaux					
	Témoin (T)	OVA	BO	O/BO	UD	O/UD
Poids initial (g)	144,17 ± 2,77	145,57 ± 2,62	145,14 ± 2,07	144,57 ± 1,88	144,29 ± 1,86	144,71 ± 3,62
Poids final (g)	261,66 ± 4,41	254,28 ± 4,12	269,2 ± 1,99	258,42 ± 6,09	267 ± 4,69	265 ± 6,24
Gain de poids (g)	+117,49	+108,71	+124,06	+113,85	+122,71	+120,29
PC par rapport au lot T (%)	-	-2,82	2,88	-1,25	2,04	1,27
PC par rapport au lot OVA (%)	-	-	-	1,63	-	4,21
PR des poumons (g)	0,74 ± 0,13	0,91 ± 0,13	0,72 ± 0,02	0,72 ± 0,06	0,76 ± 0,06	0,78 ± 0,04
PR des poumons par rapport au lot T (%)	-	22,97	-2,70	-2,70	2,70	5,40
PR des poumons par rapport au lot OVA (%)	-	-	-	-20,87	-	-14,28
PR du foie (g)	3,38 ± 0,13	3,91 ± 0,17	3,43 ± 0,16	3,84 ± 0,13	3,44 ± 0,24	3,83 ± 0,27
PR du foie par rapport au lot T (%)	-	15,68	1,47	13,60	1,77	13,01
PR du foie par rapport au lot OVA (%)	-	-	-	-1,79	-	-2,30

2.1.2. Effet sur le poids relatif du foie et des poumons

D'après le tableau 12, il n'existe pas de variation significative au niveau des poids des deux organes étudiés, à savoir le foie et les poumons. Mais, on note quant même une augmentation de 22,97% et 15,68% des poids relatifs du foie et des poumons, respectivement, chez les rats du lot OVA comparativement aux témoins.

Lors du traitement des rats sensibilisés à l'ovalbumine par la bourrache, nous observons une diminution de 20,87% dans les poumons et de 1,79% dans le foie. De même dans le lot O/UD, la diminution du poids est de 14,28% dans les poumons et de 2,30% dans le foie.

Au niveau des lots de rats chez lesquels les plantes ont été administré (lot BO et lot UD), on note de légères variations par rapport au lot témoin. Dans les poumons, l'administration de la bourrache provoque la perte de 2,70% du poids et celle de l'ortie un gain de la même valeur. Dans le foie, nous notons un gain de 1,47% lors de l'utilisation de la bourrache et de 1,77% pour l'ortie.

2.2. Etude des paramètres de la réponse inflammatoire

Afin d'évaluer les variations dans la réponse inflammatoire, nous présentons ci-après les résultats de la numération cellulaire et du dosage de l'interleukine-4, tous deux effectués aussi bien au niveau du sang qu'au niveau du liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA). Ainsi que les résultats de l'étude histologique au niveau des poumons.

2.2.1. Taux des leucocytes dans le sang

Les résultats obtenus révèlent une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de la concentration sanguine en globules blancs (GB) chez les rats sensibilisés à l'OVA par rapport aux rats témoins. Cette augmentation a atteint 60,70%. Par contre, nous observons une diminution significative du taux des GB ($p \leq 0,05$) de 33,50% et 32,75% chez les rats traités avec la bourrache (O/BO) et l'ortie (O/UD), respectivement par rapport aux rats sensibilisés (OVA) (tableau 13).

De même, le tableau 13 montre que le taux des lymphocytes chez le lot exposé à l'ovalbumine augmente de façon hautement significative ($p \leq 0,01$) par rapport au lot témoin. Cette augmentation a atteint 63,65%. Par contre, ce taux diminue significativement ($p \leq 0,05$) chez les lots traités par les extraits de nos deux plantes (24,77% et 29,22%, respectivement pour la bourrache et l'ortie). Quant aux lots BO et UD, ils ne montrent pas de variation significative des taux des GB et de lymphocytes par rapport au lot témoin (tableau 13).

2.2.2. Numération des leucocytes dans le liquide du LBA

Le résultat des variations des taux en éosinophiles et en lymphocytes dans le liquide du LBA est présenté dans le tableau 14. Ce tableau montre une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux des éosinophiles et des lymphocytes dans le liquide broncho-alvéolaire chez le lot sensibilisé à l'ovalbumine. Ces augmentations ont atteint 499,46% et 177,34% respectivement par rapport au lot témoin. D'autre part, le traitement des rats sensibilisés à l'ovalbumine avec l'extrait d'ortie diminue de façon significative les taux d'éosinophiles ($p \leq 0,01$) et de lymphocytes ($p \leq 0,05$) (60% et 42,30%, respectivement) dans le liquide du LBA des rats sensibilisés et traités par la plante. De même, l'extrait de bourrache diminue significativement ($p \leq 0,05$) le taux des lymphocytes et des éosinophiles de 53,34% et 30,75% par rapport au lot OVA.

Les lots traités avec les deux plantes (lot BO et UD) ne montrent pas de variation significative par rapport au lot T.

Tableau XIII. Variation des taux de globules blancs (GB) et de lymphocytes (Lc) dans le sang

Variations	Lots expérimentaux					
	Témoin	OVA	BO	O/BO	UD	O/UD
GB (x10³/µl)	9,6 ± 0,59	15,42 ± 0,44**	10,22 ± 0,40	10,26 ± 0,90#	10,50 ± 0,32	10,37 ± 0,78#
GB par rapport au lot T (%)	-	60,70	6,51	6,88	9,38	8,07
GB par rapport au lot OVA (%)	-	-	-	-33,50	-	-32,75
Lc (x10³/µl)	7,18 ± 0,53	11,75 ± 0,35**	7,32 ± 0,32	8,84 ± 0,49#	7,30 ± 0,39	8,31 ± 0,47#
Lc par rapport au lot T (%)	-	63,65	1,95	23,11	1,67	15,83
Lc par rapport au lot OVA (%)	-	-	-	-24,77	-	-29,22

es valeurs représentent la moyenne de trois mesures ± SE.* : Différence significative comparativement au témoin (p ≤ 0,05) ; ** : Différence hautement significative comparativement au témoin (p ≤ 0,01) ; *** : Différence très hautement significative comparativement au témoin (p ≤ 0,001) ; # : Différence significative comparativement au lot sensibilisé (p ≤ 0,05) ; ## : Différence hautement significative comparativement au lot sensibilisé (p ≤ 0,01) ; ### : Différence très hautement significative comparativement au lot sensibilisé (p ≤ 0,001)

Tableau XIV. Numération des éosinophiles et des lymphocytes dans le liquide du LBA

Paramètres	Lots expérimentaux					
	Témoin	OVA	BO	O/BO	UD	O/UD
Eosinophiles %	5,56 ± 3,20	33,33 ± 2,22**	4,33 ± 1,92	15,77 ± 2,22#	4 ± 5,55	13,33 ± 2,22##
% par rapport à T	-	499,46	-22,12	179,67	-28,05	139,74
% par rapport à OVA	-	-	-	-53,34	-	-60,00
Lymphocytes %	20,83 ± 5,55	57,77 ± 2,22**	25 ± 3,33	40 ± 2,22#	24,66 ± 3,33	33,33 ± 2,22#
% par rapport à T	-	177,34	20,01	92,03	18,36	60,00
% par rapport à OVA	-	-	-	-30,75	-	-42,30

Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures ± SE.* : Différence significative comparativement au témoin ($p \leq 0,05$) ; ** : Différence hautement significative comparativement au témoin ($p \leq 0,01$) ; *** : Différence très hautement significative comparativement au témoin ($p \leq 0,001$) ; # : Différence significative comparativement au lot sensibilisé ($p \leq 0,05$) ; ## : Différence hautement significative comparativement au lot sensibilisé ($p \leq 0,01$) ; ### : Différence très hautement significative comparativement au lot sensibilisé ($p \leq 0,001$)

2.3. Dosage de l'interleukine-4

Les variations observées concernant le taux de l'interleukine-4 dans le sérum et le liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA) chez les différents lots de rats sont montrées dans la figure 82.

Nous pouvons observer une augmentation de la concentration de l'IL-4 dans le sérum et le liquide du LBA des rats sensibilisés par rapport aux rats témoins (43,38% et 17,76%, respectivement).

Le traitement par les plantes a fait diminuer ces taux chez les rats sensibilisés et traités par les deux plantes (O/BO, O/UD) par rapport aux rats sensibilisés (OVA) de 10,42% et 12,05% au niveau du sang et des poumons pour l'extrait de bourache et de 12,63% et 14,36% au niveau de ces deux compartiments pour l'extrait d'ortie, respectivement.

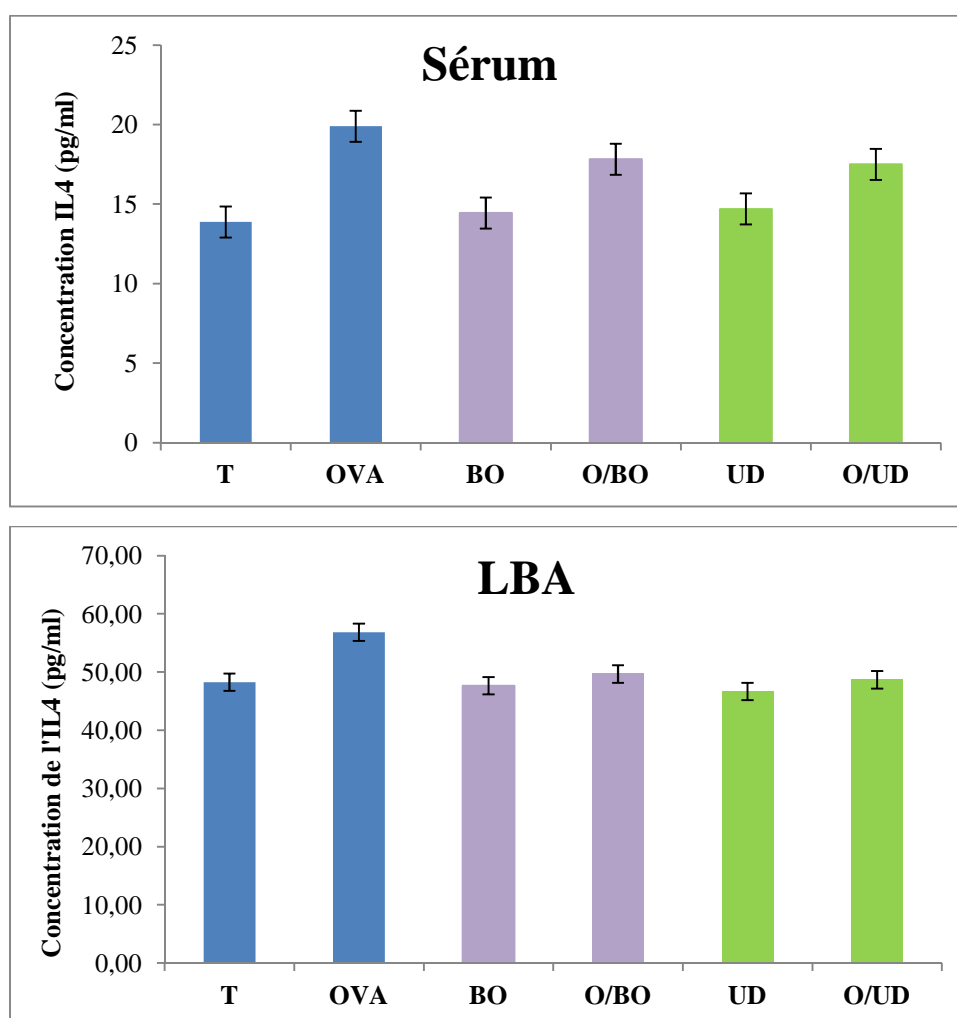


Figure 82 : Variation de la concentration de l'interleukine-4 (IL-4) dans le sérum et le liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA) chez les six lots expérimentaux.

Chez les lots BO et UD traités avec l'extrait aqueux de bourrache et d'ortie, le taux d'IL-4 dans le sérum augmente de 4,04% et de 5,88%, respectivement. Dans le liquide du LBA, le taux de l'IL-4 diminue de 1,27% pour la bourrache et de 3,33% pour l'ortie.

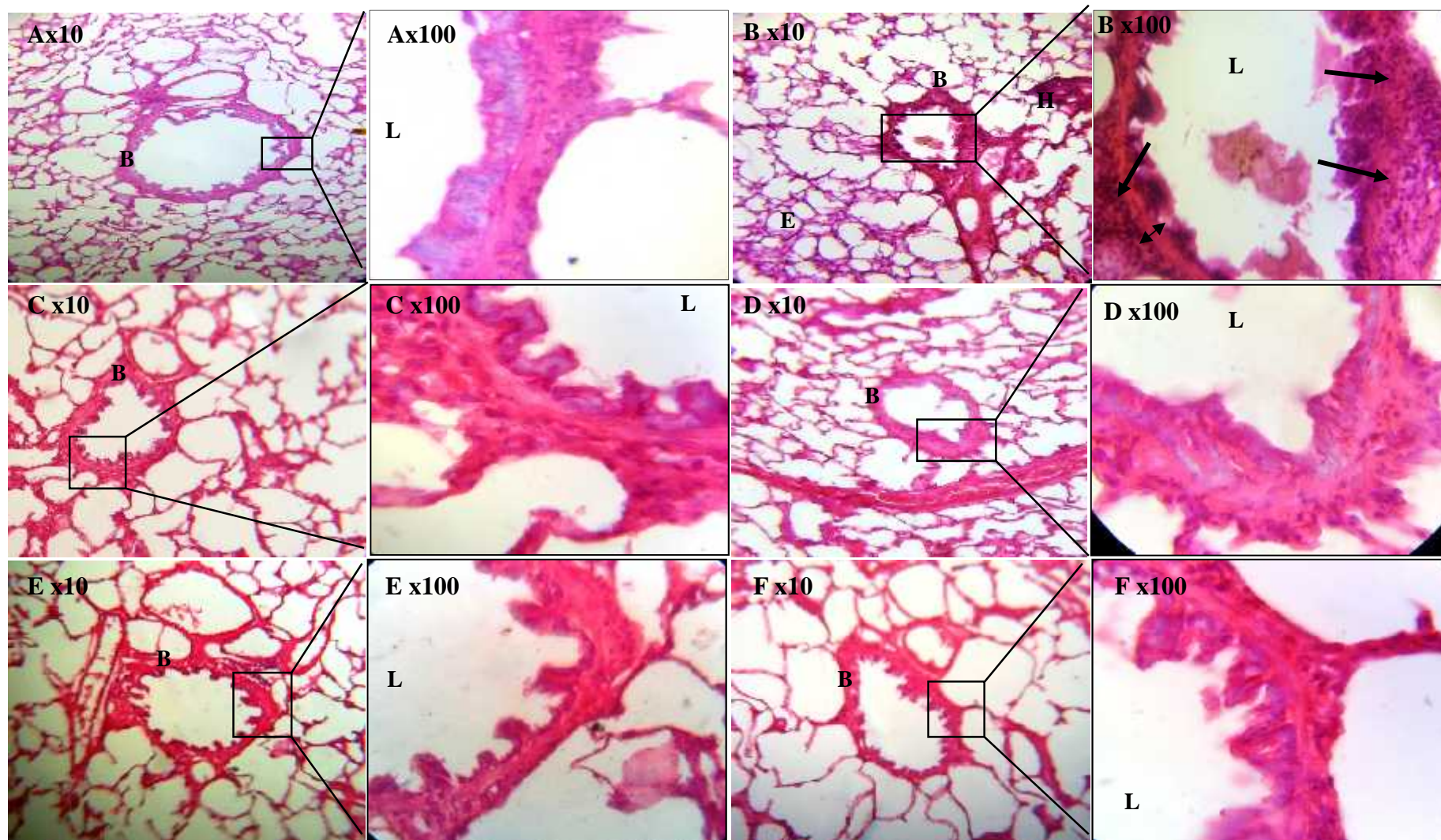
2.4. Etude histologique

L'infiltration des leucocytes dans le tissu pulmonaire est un marqueur du développement de l'asthme. Dans ce présent modèle d'asthme expérimental, induit par l'ovalbumine, nous recherchons l'effet de l'administration des extraits de BO et UD sur l'histologie du poumon.

Après avoir effectué une coloration à l'hématoxyline-éosine, l'observation microscopique des coupes réalisées sur les poumons des rats témoins montre une architecture pulmonaire normale. Nous pouvons observer sur la figure 83-A que les sacs alvéolaires et la paroi des bronchioles possèdent un épithélium normal. De même, les figures 83-E et 83-F correspondant respectivement aux coupes histologiques des lots BO et UD montrent une architecture pulmonaire normale similaire à celle du lot témoin.

Par contre, au niveau du lot OVA, chez lequel l'asthme expérimental a été provoqué, une importante infiltration cellulaire peut être observée (figure 83-B). La plupart de ces cellules inflammatoires sont composées de lymphocytes et d'éosinophiles, principalement situées autour des petites bronches, des bronchioles et des vaisseaux sanguins. De plus, nous pouvons observer des œdèmes, un épithélium épais avec quelques centres d'hémorragie et la présence de mucus et de cellules inflammatoires dans la lumière des bronchioles (figure 83-B).

Quant à l'observation microscopique des coupes histologiques des rats sensibilisés à l'OVA et traités avec les plantes (la bourrache et l'ortie), elles montrent des signes de correction histologique avec une infiltration minimale, diminution ou absence de mucus et de cellules inflammatoires au niveau de la lumière des bronchioles et une diminution de l'épaisseur de l'épithélium (figure 83-C et 83-D).



(A) Poumon d'un rat témoin montrant la représentation normale du poumon (lot T); (B) poumon d'un rat sensibilisé avec de l'ovalbumine, montrant l'infiltration inflammatoire (flèche) qui se traduit par l'accumulation apparente des éosinophiles et d'autres lymphocytes (lot OVA) ; (C) Poumon d'un rat sensibilisé à l'ovalbumine et traité avec l'extrait de BO (lot O/BO) ; (D) Poumon d'un rat sensibilisé à l'ovalbumine et traité avec l'extrait d'UD (lot O/UD) ; (E) Poumon d'un rat traité avec l'extrait de BO (lot BO) ; (F) Poumon d'un rat traité avec l'extrait d'UD (lot UD). B : bronchiole ; E : œdème ; H : hémorragie ; L : lumière de la bronchiole ;

Figure 83: Coupes histologiques des poumons de rats des six lots expérimentaux (HE x10 et x100).

❖ Discussion

Les troubles immuno-inflammatoires sont souvent associés à une perte du poids corporel aussi bien chez des patients asthmatiques (Elwood et *al.*, 1992) que chez des rats sensibilisés à l'OVA (Elwood et *al.*, 1991 ; Amit et *al.*, 2013).

D'ailleurs, nous retrouvons parmi les résultats de notre expérimentation une diminution de 2,82% du poids corporel chez les rats sensibilisés à l'ovalbumine par rapport au lot témoin. Par contre, nos résultats montrent un regain du poids corporel des rats sensibilisés à l'OVA et traités avec la bourrache (1,63%) et l'ortie (4,21%) par rapport bien sûr au lot OVA, ce qui suggère que l'administration des plantes a un certain effet protecteur.

Par ailleurs, nous n'enregistrons aucune variation significative de la croissance corporelle chez les rats sensibilisés à l'OVA et traités avec les deux plantes par rapport au lot OVA. Nos résultats semblent ainsi être en accord avec les travaux de Mahajan et Mehta (2011). De même pour les deux lots traités avec les plantes seulement (lot BO et lot UD), aucune variation significative n'est enregistrée par rapport au lot témoin, néanmoins, un gain de poids de 2,88g pour le lot traité à la bourrache et de 2,04g pour celui à l'ortie est enregistré. Ce dernier résultat est en accord avec l'étude de Juma et *al.* (2015), qui on noté un gain de poids de 1,27g lors du traitement avec un extrait aqueux d'ortie. A notre connaissance très peu d'études ont testé des extraits de bourrache *in vivo*, et les changements du poids corporel n'ont été notés dans aucune de ces études.

Quant aux effets sur le poids relatif des organes, aucune variation significative n'est enregistrée entre les lots BO et UD (traités avec les plantes seulement) par rapport au lot témoin. La plus grande variation peut être appréciée par l'augmentation des poids relatifs du foie (15,68%) et des poumons (22,97%) chez les rats sensibilisés à l'ovalbumine par rapport aux rats témoins. Le poids relatif des poumons a, par contre, diminué dans les lots traités par les plantes, à savoir O/BO (-20,87%) et O/UD (-14,28%) par rapport au lot sensibilisé à l'OVA. Ceci suggère aussi que l'utilisation des deux plantes diminue les lésions tissulaires au niveau des poumons qui auraient été à l'origine de l'augmentation de leurs poids. En effet, Mauser et *al.* (2013) ont suggéré que la provocation avec l'allergène (ovalbumine, entre autre) induit une infiltration micro-vasculaire accrue et des œdèmes donc un gonflement de l'organe enflammé.

Ce phénomène inflammatoire a ainsi pour conséquence la "diapédèse", c.-à-d. la migration des cellules inflammatoires du compartiment vasculaire vers les poumons. Elle

consiste en l'extravasation des cellules sanguines vers le compartiment enflammé (ici, ce serait les poumons). En effet, il a été démontré dans maintes études que suite à l'inhalation d'un allergène, la proportion relative de certaines cellules (principalement les leucocytes) situées au niveau de la circulation sanguine ou des voies respiratoires était modifiée (Nadeau, 1994 ; Wardlaw et *al.*, 1990).

Ainsi, la migration des cellules inflammatoires et en particulier les éosinophiles dans les poumons, par chimiotactisme, et aboutissant à leur diapédèse, contribue principalement au développement de l'inflammation des voies respiratoires (Yuk et *al.*, 2007).

L'infiltration des éosinophiles est l'une des principales caractéristiques de l'inflammation allergique, associée avec une hyperréactivité bronchique et ceci par la libération de diverses protéines et des ERO. D'ailleurs, il a été prouvé que ce sont les éosinophiles activés qui induisent les dommages épithéliaux caractéristiques chez les sujets asthmatiques (Rama et *al.*, 2014).

C'est ainsi que dans le lot OVA l'augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux des éosinophiles dans le liquide du LBA par rapport au lot témoin, confirme la présence d'un recrutement de ces derniers et leur extravasation vers les poumons. Ces résultats sont en accord avec ceux de Yuk et *al.* (2007) et Lee et *al.* (2010b).

De même, dans notre présente étude, les rats exposés à l'ovalbumine (lot OVA) montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) du nombre de leucocytes sanguins par rapport aux rats témoins (Tableau 13), confirmant la présence d'un état inflammatoire comme il a été déjà décrit au cours des travaux de Xiang-hua et *al.* (2009).

D'autre part, des diminutions significatives ($p \leq 0,05$) du taux sanguin de leucocytes ont été observées entre les rats sensibilisés à l'OVA et traités avec les deux plantes et les rats sensibilisés à l'OVA. De plus, le taux d'éosinophiles diminue significativement lors de l'utilisation de la bourrache ($p \leq 0,05$) et de l'ortie ($p \leq 0,01$) dans les lots O/BO et O/UD, respectivement, par rapport au lot OVA. Ce qui suggère que le traitement à la bourrache et l'ortie permet de diminuer l'état inflammatoire en ramenant les taux de leucocytes vers leur valeur normale et en diminuant le recrutement d'éosinophiles au niveau des poumons.

D'autre part, le traitement des rats avec la bourrache et l'ortie seulement (lot BO et UD) ne montrent pas de changements significatifs par rapport au lot témoin et maintiennent donc des taux normaux de leucocytes dans le sang et le liquide du LBA. Dans ce sens, bien qu'à notre connaissance aucune étude n'a été consacré à l'effet de la bourrache spécifiquement

sur les leucocytes, plusieurs études s'accordent avec la notre afin d'affirmer qu'un traitement à l'ortie améliore les mécanismes de défenses de l'organisme (Juma *et al.*, 2015 ; Meral et Kanterm, 2004).

Parmi les leucocytes, les lymphocytes sont d'importants régulateurs de la réponse immunitaire et leur rôle dans l'asthme concerne l'inflammation chronique sous-jacente à la maladie. Des études ont déjà démontré qu'un transfert de lymphocytes d'un rat asthmatique vers un rat normal induit chez ce dernier l'hyperréactivité bronchique similaire à celle observée chez l'animal asthmatique (Umetsu *et al.*, 2003). Ces résultats mettent en évidence l'étendue du pouvoir modulateur que ces cellules ont sur le système immunitaire et sur l'environnement pulmonaire (Spahr, 2007). De plus, plusieurs études sur le rat et le cochon d'inde, chez lesquels l'asthme expérimental a été provoqué par exposition à l'ovalbumine, montrent une augmentation du taux des lymphocytes (Pankaj *et al.*, 2011 ; Xiang-hua *et al.*, 2009). D'ailleurs, C'est ce que nos résultats confirment avec une augmentation significative ($p \leq 0,01$) du taux des lymphocytes chez le lot OVA par rapport au lot témoin dans le sang et le liquide du LBA.

Ainsi, chez les lots traités par les extraits de plantes, O/BO et O/UD, les taux de lymphocytes diminuent (Tableau 13). En effet, nous pouvons observer une diminution significative ($p \leq 0,05$) du nombre de lymphocytes chez les rats exposés à l'OVA et traités à l'ortie par rapport aux rats du lot OVA dans le sang et dans le liquide du LBA. De même, le traitement avec la bourrache montre une diminution significative ($p \leq 0,05$) de leur taux dans le sang et le liquide du LBA. Ces diminutions s'expliquent par une diminution du recrutement des lymphocytes affirmant encore une fois la diminution de l'inflammation pulmonaire, plus marqué lors du traitement par l'ortie (Tableau 13 et 14).

En fait, dans l'inflammation asthmatique, les cellules infiltrées tels que les éosinophiles et les lymphocytes ainsi que les macrophages et les mastocytes secrètent les cytokines Th2 (Yuk *et al.*, 2007), parmi lesquelles l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-4. Cette dernière revêt une importance particulière, puisqu'elle agit comme un facteur de croissance pour les cellules Th2. Elle est le principal médiateur de la commutation de classe des immunoglobulines (Ig) vers l'isotype E (IgE) par les lymphocytes B (Manis *et al.*, 2002; Murphy et Reiner, 2002) et induit l'expression du récepteur de faible affinité, FcεRII, pour les IgE (Belleau *et al.*, 2005).

De plus, l'IL-4 favorise la migration des éosinophiles vers le tissu pulmonaire et leurs adhésions aux cellules endothéliales (Fukuda *et al.*, 1996), ainsi que la production de mucus (Temann *et al.*, 1997).

C'est ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est à l'origine de l'afflux de cellules inflammatoires vers les poumons (voie d'entrée principale de l'allergène inhalé). Parmi ces cellules, les éosinophiles, ont une place de choix dans les réponses allergiques au niveau des voies respiratoires des asthmatiques. Ce qui induit la prolifération de fibroblaste, la synthèse de collagène et la maturation des myofibroblastes, qui contribuent par conséquent au dépôt de collagène et aux dommages alvéolaires (Kay et *al.*, 2004). De plus, l'augmentation des taux de cytokines inflammatoires (l'IL- 4 et l'IL-5) stimule la transformation profibrotique du TGF- β , qui est exprimé dans diverses cellules pulmonaires comme les macrophages alvéolaires, les fibroblastes et les cellules endothéliales en induisant l'augmentation de l'accumulation de la matrice extracellulaire et de l'épaississement des septa inter-alvéolaires (Halwani et *al.*, 2011). Ces changements structurels et architecturaux au niveau des bronches contribuent au phénomène connu sous le nom de remodelage des voies respiratoires (Jacobsen et *al.*, 2007 ; Ra et *al.*, 2010). En effet, nous observons une importante infiltration de cellules inflammatoires, un épithélium épais, des œdèmes, avec quelques centres d'hémorragie et la présence de mucus et de cellules inflammatoires dans la lumière des bronchioles au niveau des poumons des rats sensibilisés à l'OVA (lot OVA) (figure 83-B). Alors que notre étude suggère l'effet anti-inflammatoire et anti-asthmatique de nos deux plantes, puisque le traitement avec la bourrache (lot O/BO) et l'ortie (lot O/UD) nous permet de constater une nette diminution de l'afflux des cellules inflammatoires vers les poumons et la diminution de tout signe d'inflammation et d'obstruction bronchique (figure 83 : C et D). De même les lots BO et UD ne montrent pas de différences par rapport au lot témoin.

De plus, d'après la figure 82, la sensibilisation à l'ovalbumine a donc induit une augmentation de l'interleukine-4, cytokine pro-inflammatoire (Th2) (19,89 pg/ml dans le sérum et 56,84 pg/ml dans le liquide du LBA). Par contre, le traitement des rats sensibilisés par les extraits de bourrache et d'ortie diminue la concentration de l'IL-4 de 10,42% et 12,05% dans le sérum et de 12,63 % et 14,36 % dans le liquide du LBA, respectivement.

D'autre part, les lots traités avec les plantes (lot BO et UD) seulement ne montrent pas de différences notables par rapport au lot témoin. En effet, quelques travaux ont noté que l'huile de bourrache affecte la production de l'IL-4 *in vitro* (Harbige et *al.*, 1997) et que l'extrait de feuilles d'*Urtica dioica* inhibe la production pro-inflammatoire du facteur de transcription NF- κ B (Riehemann et *al.*, 1999).

La réduction de la concentration d'IL-4 peut être associée à un rétablissement de la balance entre les cytokines Th1 et les cytokines Th2. Ceci a été suggéré par plusieurs études effectuées sur les molécules bioactives des plantes. Nous citons à titre d'exemple l'étude de Pankaj et *al.*, (2011) dans laquelle les auteurs ont expliqué que la chryisine, un flavonoïde de type flavone, diminue l'infiltration des cellules inflammatoires dans un modèle d'asthme murin en rétablissant la balance Th1/Th2. D'autre part, Kandasamy et *al.*, (2012) supposent que l'activité antiasthmatique des flavonoïdes est probablement due à l'inhibition du facteur NF- κ B. En tous cas, plusieurs autres études comme celles de Jung et *al.* (2010), Allan et Devereux (2011) et Kandasamy et *al.* (2012) ont tous rapporté l'effet bénéfique des composés phénoliques sur les symptômes asthmatiques.

Or, dans notre présente étude, notamment dans l'étude *in vitro*, nous avons bel et bien rapporté que nos extraits de plantes étaient non seulement riches en composés phénoliques mais qu'ils avaient un potentiel antioxydant et même anti-inflammatoire particulièrement important.

De plus, les composés identifiés dans l'extrait aqueux d'ortie (Güler, 2013) possèdent un effet anti-inflammatoire (la quercétine, l'acide caféique, l'acide gallique, des caroténoïdes et de la scopolétine) et un effet antiallergique (l'acide gallique, la scopolétine et la quercétine). Une étude a prouvé que la quercétine régule la balance Th1/Th2 dans un modèle d'asthme murin (Park et *al.*, 2009). De même quelques composés identifiés dans l'extrait aqueux de bourrache, ont été étudiés pour leur pouvoir anti-inflammatoire (l'acide p-hydroxyphényl lactique, la lutéoline, le Kaempférol triméthyle éther), vasodilatateur (le kaempférol, l'oleuropéine), vasorelaxant (la lutéoline), immunomodulateur et antiallergique (le kaempférol) (voir annexe 10).

En fin, il paraît clair que les extraits aqueux des plantes utilisés sont parvenus à rétablir l'état inflammatoire grâce aux propriétés des molécules bioactives qu'ils contiennent. De plus, nous avons observé aux chapitres précédents que ces derniers possèdent un important pouvoir antioxydant *in vitro* d'où la nécessité d'étudier leurs effets sur le stress oxydatif généré par l'inhalation de l'allergène, et qui participe à son tour à exacerber l'inflammation bronchique.

VARIATIONS DES PARAMETRES DU STRESS OXYDANT

La grande surface, la vascularisation et l'environnement riche en oxygène des poumons les rendent très sujets aux perturbations dues au stress oxydatif. Par conséquent, la présence des antioxydants au niveau pulmonaire est cruciale afin d'assurer la protection contre les dommages tissulaires (Zuo et *al.*, 2013). Aussi, dans le but de lutter contre les effets indésirables des ERO, diverses stratégies d'antioxydants endogènes sont développées par l'organisme, intégrant à la fois des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques. Parmi ces derniers, nous avons dosé le MDA, le GSH, le GPx, la SOD et la CAT dans les poumons mais aussi dans les érythrocytes et le foie des rats témoins et des rats traités.

2.5. La peroxydation lipidique (dosage du malondialdéhyde)

D'après les résultats obtenus (figure 84), nous pouvons constater une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux de MDA dans le foie (50%), dans les poumons (67,99%) et au niveau des érythrocytes (58,12%) chez les rats sensibilisés à l'OVA par rapport aux rats témoins. Tandis que les rats traités par les deux plantes ne montrent aucune différence significative du taux de MDA par rapport aux rats témoins aussi bien au niveau du foie, qu'au niveau des poumons et des érythrocytes (pour la bourrache : -10,99%, -26,63% et -30,17% respectivement et pour l'ortie : -3,01%, -24,12% et -29,91%).

En ce qui concerne les rats sensibilisés avec l'OVA et traités par les deux plantes, la diminution du taux de MDA, par rapport aux rats sensibilisés avec l'OVA, est significative ($p \leq 0,05$) dans les poumons, avec une diminution de 50,28% lors du traitement avec la bourrache et de 48,58% lors du traitement avec l'ortie.

2.6. Le glutathion réduit

Nous pouvons observer, d'après la figure 85, une diminution du taux de GSH chez le lot OVA par rapport au lot témoin dans le foie (-16,31%) et significativement ($p \leq 0,05$) dans les poumons (-46,92%) et les érythrocytes (-15,03%). Par contre, nous enregistrons des augmentations de la GSH dans les lots sensibilisés et traités par la bourrache et l'ortie au niveau du foie de l'ordre de 16,15 % et 3,96%, au niveau des poumons de l'ordre de 80,81% et 27,78% et au niveau des érythrocytes de l'ordre de 16,53% et 12,30%, respectivement. Mais seule l'augmentation au niveau des poumons des rats sensibilisés et traités par la bourrache est significative ($p \leq 0,05$). On note également que les taux de GSH ne varient pas significativement chez les rats des lots traités (BO et UD) par rapport aux témoins (ces

variations sont respectivement de : -0,74% et -0,58% dans le foie ; +2,95% et -0,54% dans les poumons et +14,05% et +18,63% dans les érythrocytes).

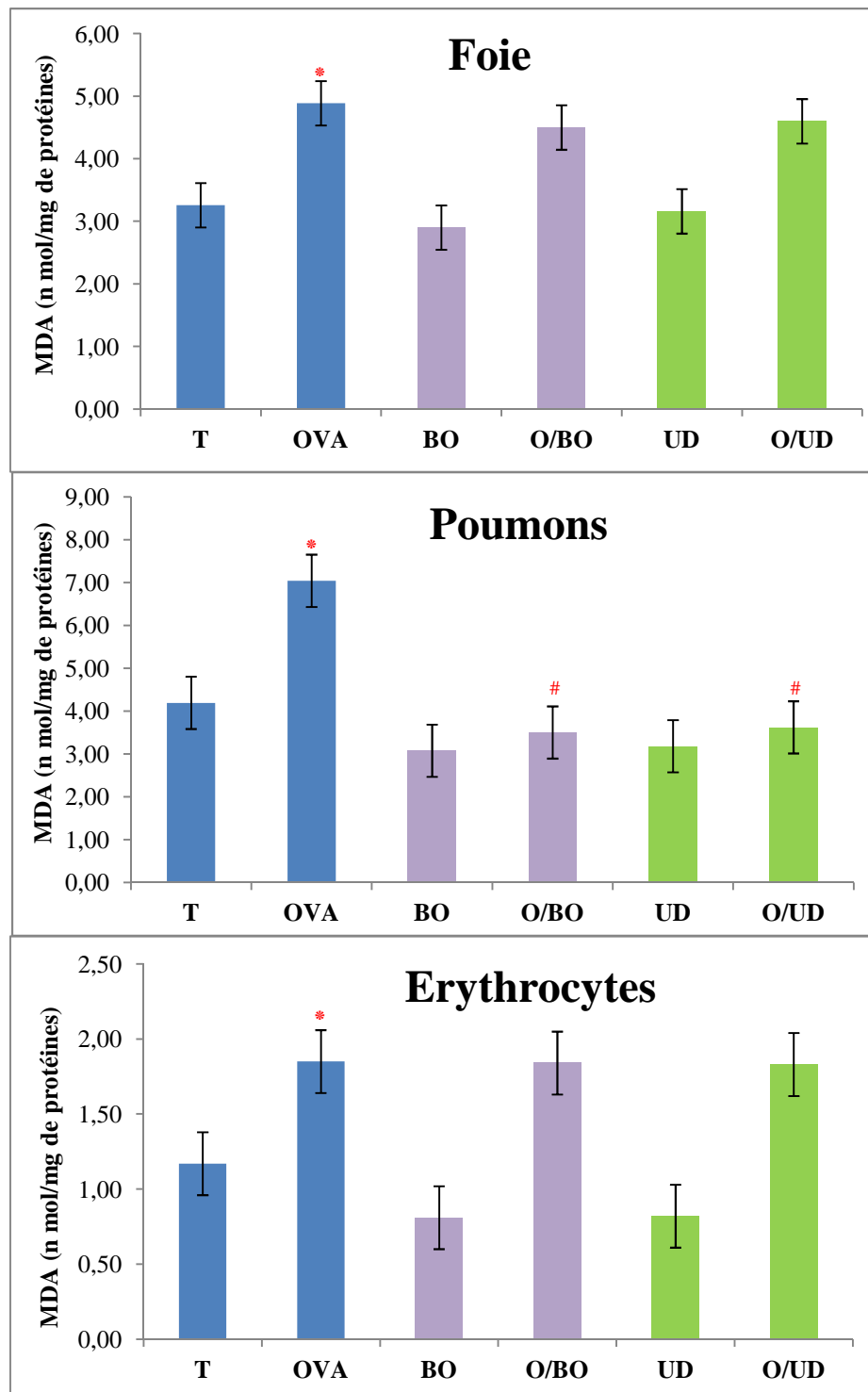


Figure 84: Variations du malondialdéhyde (n mol/mg de protéines) dans les érythrocytes et les organes (Foie et poumons) chez les rats témoins et traités.

* : Différence significative comparativement au témoin ($p \leq 0,05$) ;
 # : Différence significative comparativement au lot OVA sensibilisé ($p \leq 0,05$)

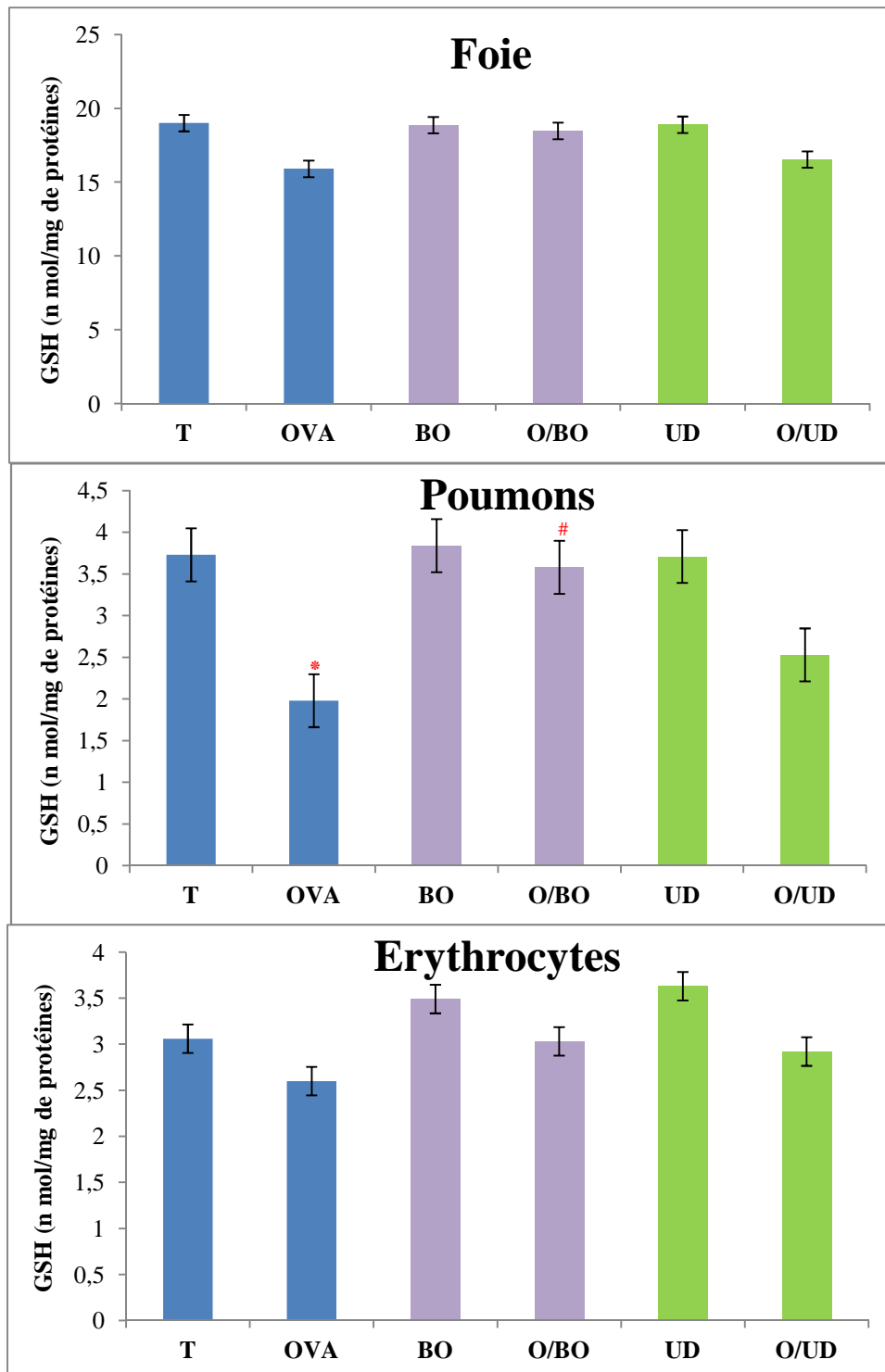


Figure 85: Variation de la GSH (n mol/mg de protéines) dans les érythrocytes et les organes (Foie et poumon) chez les rats témoins et traités.

* : Différence significative comparativement au témoin ($p \leq 0,05$) ;
 # : Différence significative comparativement au lot OVA sensibilisé ($p \leq 0,05$).

2.7. La glutathion peroxydase

D'après la figure 86, on constate qu'il existe, entre le lot témoin et le lot sensibilisé (OVA), une diminution significative ($p \leq 0,05$) de l'activité enzymatique de la GPx au niveau des poumons et des érythrocytes (une diminution de 62,96% et 50%, respectivement).

Le traitement des rats sensibilisés avec les extraits de bourache et d'ortie induit une augmentation de la concentration de la GPx dans les poumons par rapport au lot sensibilisé (150% et 10%, respectivement pour les deux plantes). Cette augmentation est significative pour l'extrait de bourache ($p \leq 0,05$).

Alors que le traitement des rats avec les extraits de plantes seulement ne montre pas de variation significative par rapport au lot témoin. Le traitement avec la bourrache ne change pas le taux de la GPx dans le foie, mais induit une augmentation de 7,41% dans les poumons et de 30% dans les érythrocytes.

Quant au traitement avec l'ortie, il induit une augmentation du taux de GSH de 4% dans le foie, de 3,70% dans les poumons et de 16,67% dans les érythrocytes.

2.8. La superoxyde dismutase

Les résultats du dosage de la superoxyde dismutase au niveau des érythrocytes et des organes (foie et poumons) sont illustrés dans la figure 87.

Le traitement des rats par l'ovalbumine entraîne une diminution significative ($P \leq 0,05$) du taux de la SOD chez les rats sensibilisés par l'OVA en comparaison avec le groupe témoin et ce au niveau des poumons (-59,20%). On note aussi des diminutions de 40,68% et 13,99% dans le foie et les érythrocytes, respectivement.

Des augmentations dans la SOD ont été enregistrés chez les rats sensibilisés et traités par les extraits de plantes (lots O/BO et O/UD) de l'ordre de 21,90% et 0,47% (foie), 109,76% et 39,02% (poumons), 13,67% et 14,03% (érythrocytes), respectivement. L'augmentation est significative ($p \leq 0,05$) au niveau des poumons chez les rats traités avec la bourrache.

Aucune variation significative n'est enregistrée chez les lots traités avec la bourrache et l'ortie par rapport au lot T. Les variations sont, respectivement, pour les lots BO et UD comme suit : 2,82%, -7,34% (foie) ; 1,99%, -5,47% (poumons) et 14,24%, 11,46% (érythrocytes).

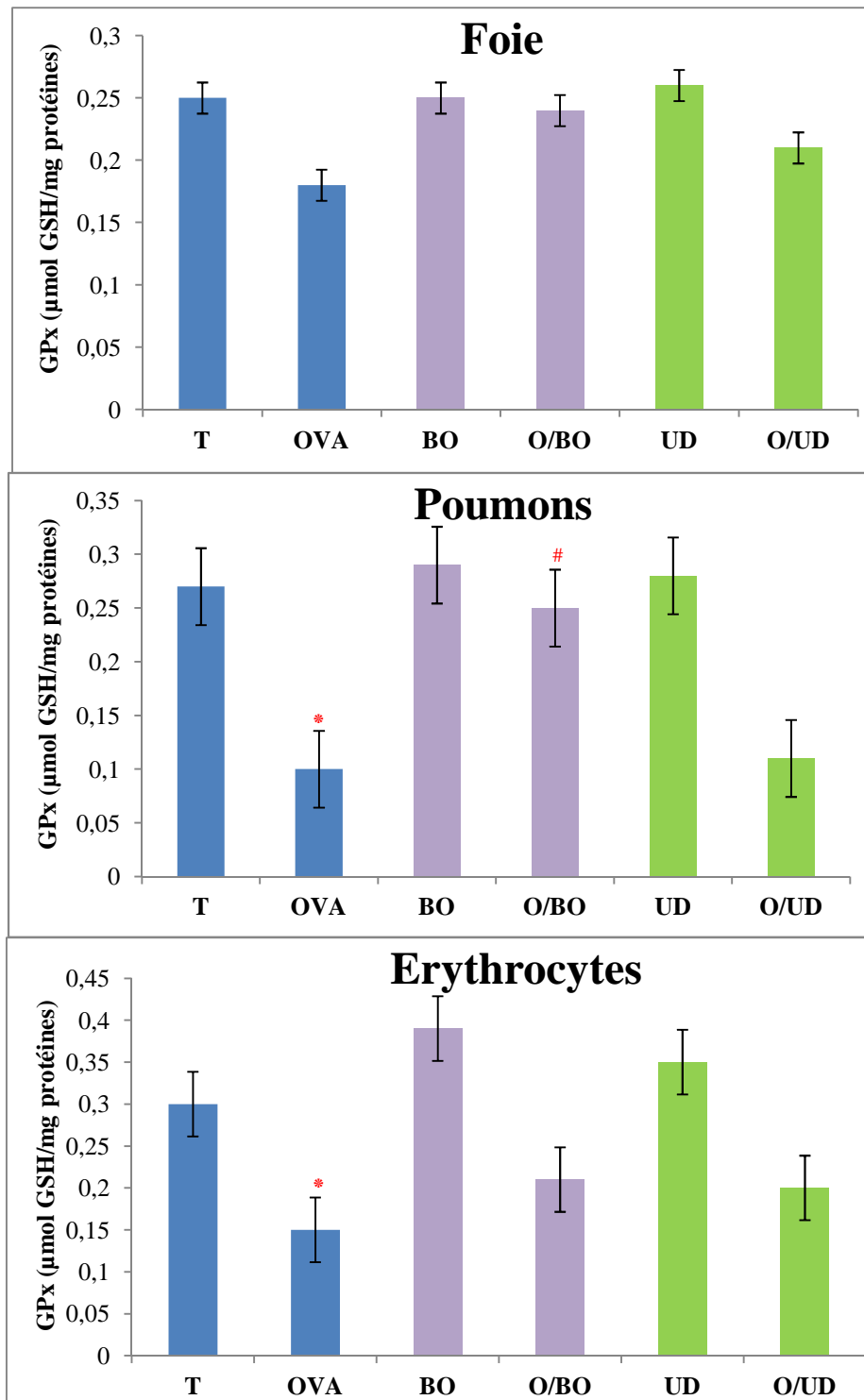


Figure 86: Variation de la GPx (µmol GSH/mg de protéines) dans les érythrocytes et les organes (Foie et poumons) chez les rats témoins et traités.

* : Différence significative comparativement au témoin ($p \leq 0,05$) ;
 # : Différence significative comparativement au lot sensibilisé ($p \leq 0,05$).

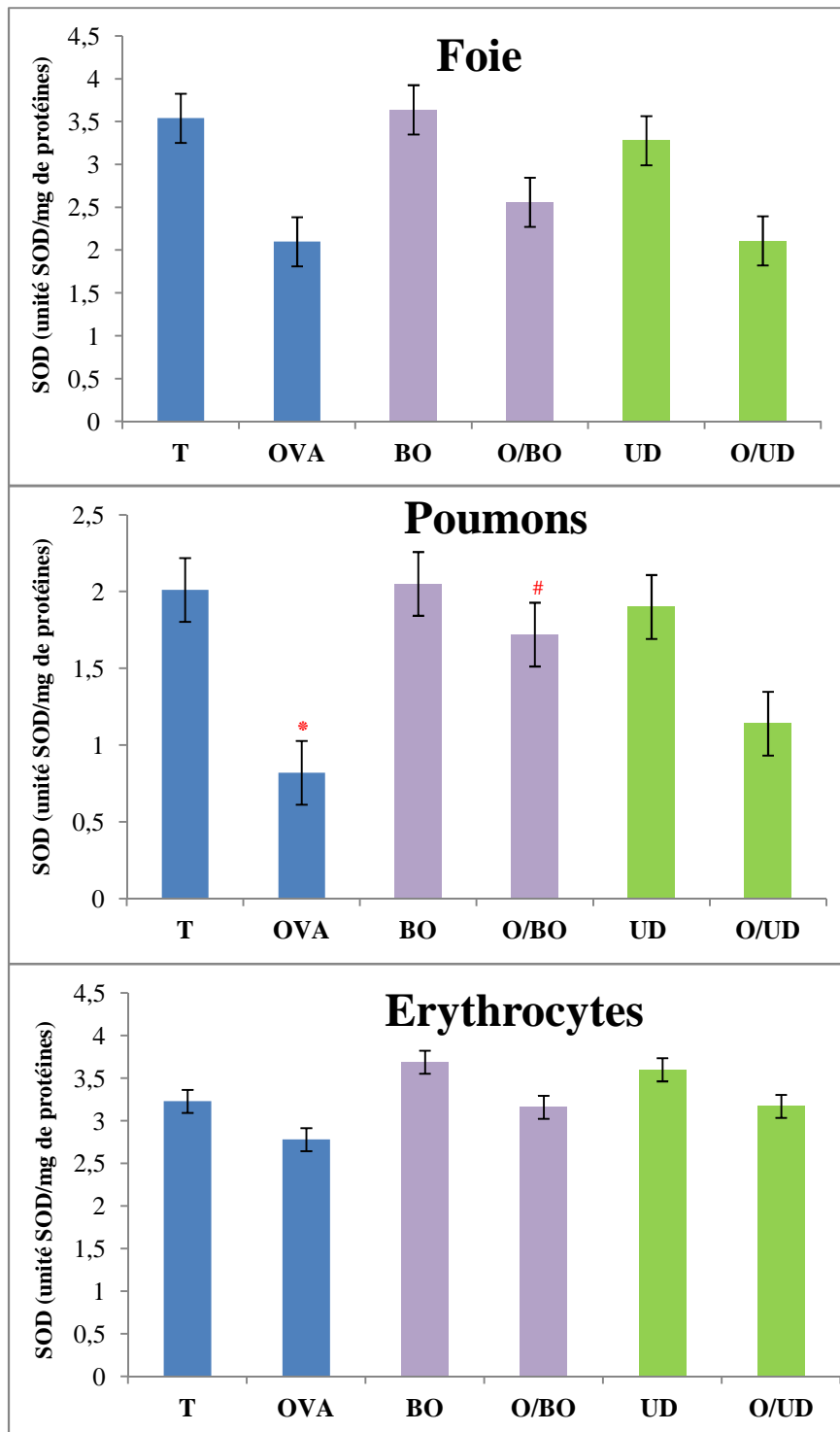


Figure 87: Variation de la SOD (unité SOD/mg de protéines) dans les érythrocytes et les organes (Foie et poumons) chez les rats témoins et traités.

* : Différence significative comparativement au témoin ($p \leq 0,05$) ;
 # : Différence significative comparativement au lot sensibilisé ($p \leq 0,05$).

2.9. La catalase

Les résultats de la figure 88 ne montrent aucune différence significative entre les lots expérimentaux. Néanmoins, les variations les plus importantes sont caractérisées, comme pour les autres paramètres du stress oxydant, par une diminution chez le lot OVA par rapport au lot témoin, dans le foie (23,77%), les poumons (41,01%) et les érythrocytes (38,22%). Mais aussi, par l'augmentation du taux de la catalase chez les lots sensibilisés et traités avec les plantes par rapport au lot sensibilisé à l'ovalbumine (OVA) et ce au niveau du foie, des poumons et des érythrocytes de l'ordre de 17,76%, 10,80% et 34,25% pour la bourache, et de l'ordre de 27,33%, 10,87% et 31,28% pour l'ortie, respectivement.

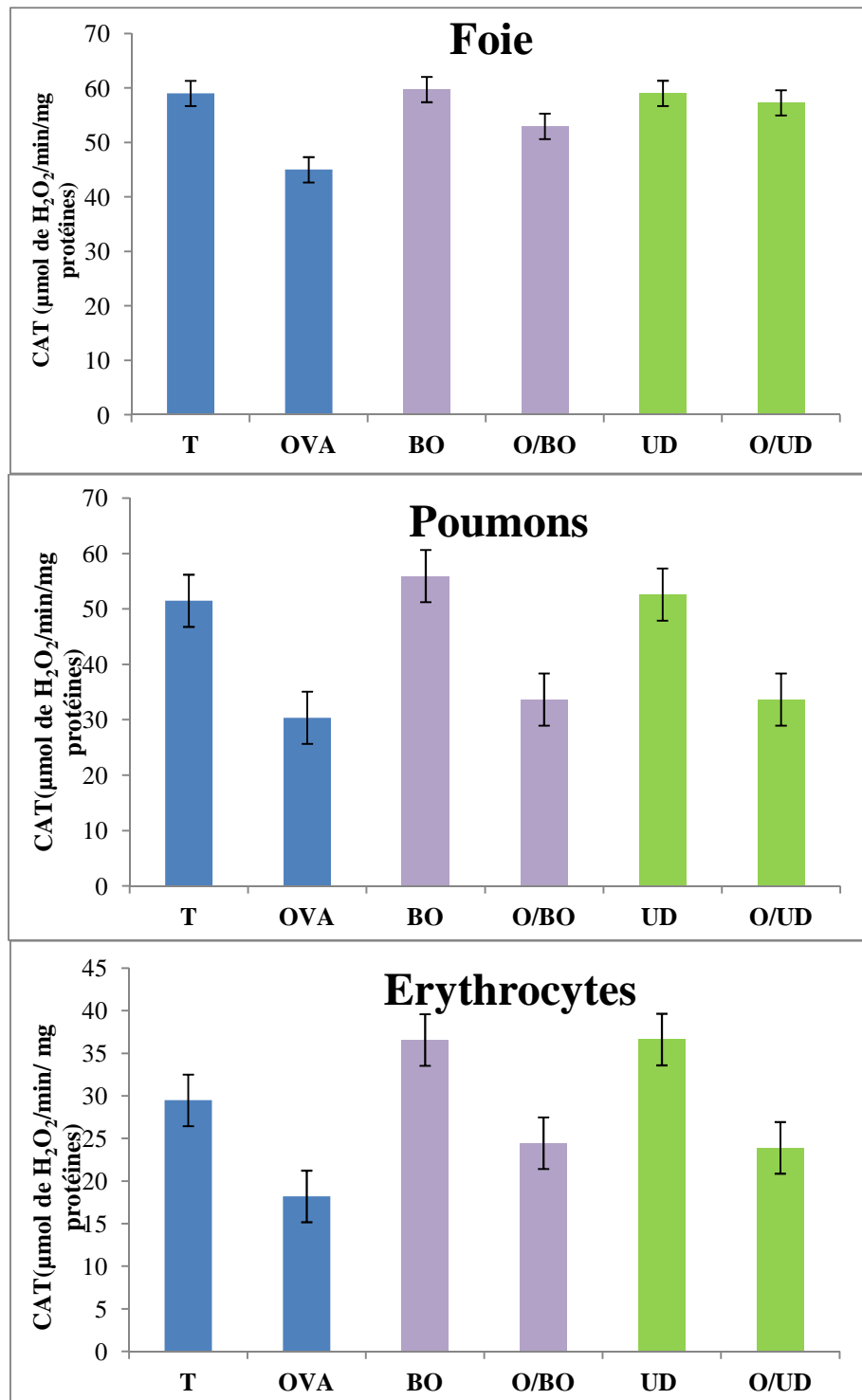


Figure 88: Variation de la CAT ($\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) dans les érythrocytes et les organes (Foie et poumons) chez les rats témoins et traités.

2.10. Etude de la corrélation entre les paramètres étudiés:

Dans cette partie, nous avons jugé utile de rechercher le lien entre les différents paramètres évalués au cours de notre travail expérimental en calculant les coefficients de corrélations correspondants. Nous rappelons également que lorsque la **relation est positive**, les deux paramètres varient dans le même sens, c'est-à-dire si l'on observe que les valeurs fortes de l'un correspondent généralement aux valeurs fortes de l'autre et vice versa. Par contre, une **relation est négative** si les deux paramètres varient en sens inverse, c'est-à-dire si l'on observe que les valeurs fortes de l'un correspondent généralement aux valeurs faibles de l'autre et vice versa.

Corrélations entre les paramètres in vivo

Ainsi, le tableau 15 résume les corrélations entre les marqueurs de l'inflammation bronchique (à savoir le taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang, le taux d'éosinophiles et de lymphocytes dans le LBA et le taux d'IL-4 dans les deux compartiments) en lien avec les marqueurs du stress oxydatif (taux de MDA, de GSH et des activités enzymatiques GPx, SOD et CAT) évalués dans les poumons lors du traitement à la bourrache et à l'ortie.

D'après le tableau 15, il existe des corrélations entre l'ensemble de nos paramètres. Cette corrélation peut être faible (exemple entre IL-4 dans le LBA et la CAT lors du traitement par l'ortie) ou moyenne (exemple entre la CAT et le taux d'IL-4 et d'éosinophiles dans le LBA lors du traitement par la bourrache) à très forte (exemple entre SOD et IL-4 dans le LBA lors du traitement à la bourrache).

De plus, lors du traitement à la bourrache nous notons des corrélations significatives entre le taux de GB et le MDA, le GSH, la GPx et la SOD ; le taux de lymphocytes et le MDA, la GPx et la SOD ; le taux d'IL-4 et le MDA, explorés dans le sang. Quant aux dosages effectués dans le LBA, les corrélations significatives sont retrouvées entre le taux d'éosinophiles et le MDA, le GSH et la SOD ; le taux de lymphocytes et le MDA et la SOD ; le taux d'IL-4 et le GSH, la GPx et la SOD.

Alors que, lors du traitement à l'ortie, nous notons des corrélations significatives entre le taux de GB et le GSH et la SOD ; le taux de lymphocytes et de SOD ; le taux d'IL-4 et la SOD, dans le sang. Pour le dosage dans le LBA, il existe une corrélation significative entre le taux de GSH et l'IL-4 et le taux de lymphocytes et aussi entre ce dernier et la SOD.

Corrélations entre les paramètres in vivo versus in vitro

D'après le tableau 16, il existe une corrélation entre la teneur en phénols et le stress oxydatif au niveau des poumons (à savoir une corrélation hautement significative pour le GSH, la GPx et la SOD). Par contre, seul le taux de polyphénols a donné une corrélation significative avec la peroxydation lipidique (MDA).

Quant aux corrélations entre les teneurs en polyphénols et les paramètres de l'inflammation bronchique, on note une prédominance des corrélations hautement significatives au niveau du liquide du LBA (notamment pour le taux des éosinophiles, celui des lymphocytes et l'IL-4).

Par ailleurs, l'activité antioxydante (évaluée par trois tests : DPPH, NBT et l'activité antioxydante totale) semble être corrélée aux paramètres de l'inflammation bronchique aussi bien au niveau du sang (corrélation hautement significative pour les taux de Lc et de l'IL-4) qu'au niveau du LBA (corrélation hautement significative pour les taux d'éosinophiles, Lc et IL-4).

De plus, cette même activité antioxydante est corrélée à l'ensemble des paramètres du stress oxydatif étudiés, elle est même hautement significative avec l'activité du GSH et de la GPx.

Tableau XV. Corrélations entre les marqueurs de l'inflammation bronchique et ceux du stress oxydatif

Marqueurs du stress oxydatif Marqueurs De l'inflammation bronchique		Coefficient de corrélation Pearson (R)									
		MDA		GSH		GPx		SOD		CAT	
		BO	UD	BO	UD	BO	UD	BO	UD	BO	UD
Sang	Taux de leucocytes	0,97*	0,77	-0,97*	-0,94*	-0,98**	-0,82	-0,98**	-0,95*	-0,71	-0,68
	Taux de lymphocytes	0,97*	0,83	-0,93	-0,91	-0,97*	-0,88	-0,94*	-0,97**	-0,79	-0,76
	Taux d'IL-4	0,97*	0,86	-0,83	-0,86	-0,84	-0,92	-0,90	-0,96*	-0,87	-0,77
LBA	Taux d'éosinophiles	0,95*	0,61	-0,94*	-0,93	-0,91	-0,70	-0,98**	-0,86	-0,65	-0,50
	Taux de lymphocytes	0,99**	0,77	-0,89	-0,97*	-0,91	-0,79	-0,94*	-0,97*	-0,84	-0,71
	Taux d'IL-4	0,93	0,47	-0,99**	-0,95*	-0,97*	-0,56	-0,99**	-0,80	-0,57	-0,38

* : $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Tableau XVI. Corrélations entre les teneurs en composés phénoliques, l'activité antioxydante et les paramètres de l'inflammation bronchique et ceux du stress oxydatif

Teneur en phénols et activité antioxydante <i>in vitro</i>		Paramètres de l'inflammation bronchique						Paramètres du stress oxydatif				
		Dans le sang			Dans le liquide du LBA			Taux du MDA	Taux du GSH	Activité de la GPx	Activité de la SOD	Activité de la CAT
		Taux de GB	Taux de lymphocytes	Taux d'IL-4	Taux des lymphocytes	Taux des éosinophiles	Taux d'IL-4					
Taux des Polyphénols	BO	-0,972	-0,835	-0,913	-0,729	-0,913	-0,962	-0,998*	0,979	0,768	0,903	0,936
	UD	-0,995	-0,893	-0,998*	-0,964	-0,998*	-0,996*	-0,984	0,955	1**	0,927	0,824
Taux des ortho-diphénols	BO	-0,877	-0,949	-0,987	-0,881	-0,987	-1**	-0,981	0,891	0,907	0,983	0,995
	UD	-0,985	-0,924	-1**	-0,942	-1**	-1**	-0,968	0,975	0,997*	0,952	0,864
Taux des flavonoïdes	BO	-0,547	-0,985	-0,945	-1**	-0,945	-0,888	-0,772	0,575	0,998	0,953	0,923
	UD	-0,841	-1**	-0,919	-0,739	-0,919	-0,927	-0,796	0,985	0,892	0,996*	0,992
Taux des flavanols	BO	-1**	-0,691	-0,799	-0,558	-0,799	-0,877	-0,958	1**	0,605	0,784	0,834
	UD	-0,937	-0,978	-0,982	-0,866	-0,982	-0,986	-0,907	0,999*	0,968	0,992	0,941
Taux des tanins	BO	-0,758	-0,994	-0,999*	-0,961	-0,999*	-0,981	-0,918	0,780	0,975	1**	0,994
	UD	-0,997*	-0,882	-0,996*	-0,971	-0,996*	-0,994	-0,988	0,948	1**	0,917	0,810
Taux des Anthocyanes	BO	-0,997*	-0,733	-0,833	-0,606	-0,833	-0,904	-0,974	0,999*	0,651	0,819	0,865
	UD	-0,864	-0,999*	-0,935	-0,768	-0,935	-0,943	-0,822	0,992	0,911	0,999*	0,985

Test DPPH	BO	0,673	1**	1**	0,987	0,985	0,950	0,863	-0,699	-0,995	-0,989	0,973
	UD	0,983	0,875	0,928	0,938	1**	1**	0,965	-0,977	-0,997*	-0,956	-0,869
Test NBT	BO	0,999*	0,695	0,716	0,586	0,819	0,893	0,968	-1**	-0,632	-0,805	-0,853
	UD	0,997*	0,817	0,882	0,971	0,996*	0,994	0,988	-0,948	-1**	-0,917	-0,810
Activité antioxydante total	BO	-0,695	-0,999*	-1**	-0,982	-0,990	-0,959	-0,878	0,719	0,991	0,993	0,979
	UD	-0,986	-0,655	-0,743	-1**	-0,945	-0,938	-0,996*	0,843	0,964	0,795	0,645

* : $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

❖ Discussion

L'asthme est une maladie inflammatoire pulmonaire chronique, caractérisée par un afflux et l'activation de cellules inflammatoires tels que les macrophages alvéolaires, les neutrophiles, les éosinophiles, les lymphocytes et les mastocytes. On retrouve la notion de stress oxydant dans ces réactions d'hypersensibilité de type I où l'inflammation des voies aériennes est provoquée par la production d'ERO produites et sécrétées par les cellules inflammatoires (Dworski, 2000). Cette production est d'ailleurs corrélée à la sévérité de la maladie (Meharzi et *al.*, 2014). Ces ERO peuvent être directement responsables des lésions pulmonaires et de la contraction des muscles bronchiques.

Ainsi, le déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions au niveau des cellules de l'organisme et de ce fait plusieurs traitements visant à diminuer ce phénomène de stress oxydatif ont été envisagés, notamment à base d'extraits végétaux utilisés dans les pathologies du système respiratoire (Tiwari et *al.*, 2014 ; Lee et *al.*, 2010a ; Lee et *al.*, 2010b ; You et *al.*, 2014). Cependant, à notre connaissance aucune étude n'a évalué le pouvoir antioxydant *in vivo* de *Borago officinalis* mais quelques études ont affirmé que la supplémentation en *Urtica dioica* a permis de promouvoir les systèmes de défenses antioxydants et de diminuer la peroxydation lipidique (Kanter et *al.*, 2003 ; Ozen et Korkmaz, 2003 ; Yener et *al.*, 2008).

Nous avons donc choisi ces deux plantes médicinales locales pour mettre en évidence, pour la première fois, leurs effets anti-oxydants et anti-inflammatoires dans le cas de la pathologie asthmatique et ce par la mesure de certains marqueurs.

En fait, comme tout allergène, la pénétration de l'ovalbumine chez les rats wistar sensibilisés, crée un pontage en se liant à deux IgE sensibilisant les cellules mastocytaires et/ou les basophiles tout en provoquant la dégranulation de ces dernières. La dégranulation aboutie à la libération de médiateurs de l'inflammation (via l'acide arachidonique) tels que la phospholipase A2, COX-2, les prostaglandines et le NO qui contribuent à leur tour à l'établissement d'un état de stress oxydant au sein de l'environnement inflammatoire bronchique. En effet, l'ovalbumine, constituant ici l'agression étrangère, a un impact direct sur les activités des enzymes anti-oxydantes ce qui s'accompagne donc d'une augmentation de la quantité des radicaux libres qui à leur tour peuvent initier la peroxydation lipidique (Bulani et *al.*, 2011).

D'ailleurs, parmi les conséquences du déséquilibre antioxydant/pro-oxydant, on note les atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique survenant suite à l'oxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires et produisant des radicaux peroxydes tels que les hydroperoxydes lipidiques et ensuite des aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) (You et *al.*, 2014).

Ainsi, l'analyse de l'impact des radicaux libres sur les membranes biologiques est effectuée par un test qui permet de déterminer le degré de peroxydation lipidique par une simple mesure spectrophotométrique du malondialdéhyde (MDA). Ce paramètre constitue donc un indicateur précoce d'une agression étrangère et est souvent utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif (Giguère et *al.*, 2003).

C'est d'ailleurs ce que nous démontrons via nos résultats. Une augmentation du taux de MDA a en effet été observée dans les érythrocytes et les organes étudiés (foie et poumons) témoignant ainsi de la survenue des dommages au niveau des membranes cellulaires des différents tissus en cause. Ce résultat est en accord avec les résultats des différentes études chez des patients asthmatiques chez qui a été mis en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique après traitement par divers allergènes tels que l'ovalbumine, le LPS, les acariens...etc. (Tiwari et *al.*, 2014 ; You et *al.*, 2014).

Cette élévation du MDA, comme nous l'avons expliqué plus haut est due à l'augmentation du nombre des cellules inflammatoires activées dans les alvéoles pulmonaires qui libèrent de grandes quantités d'anions superoxydes et de peroxydes d'hydrogène. De plus, la présence du MDA dans le tissu pulmonaire pourrait accroître la chimiotaxie des leucocytes et activer la libération d'histamine, perpétuant ainsi l'inflammation (You et *al.*, 2014).

En fait, dans notre présente étude les lots BO et UD, chez lesquels seuls les extraits de plantes ont été administrés, ne montrent aucune variation significative par rapport au lot témoin. Les deux extraits maintiennent les systèmes de défenses antioxydant et n'influent pas sur la peroxydation lipidique. Par contre, le traitement des rats sensibilisés à l'ovalbumine avec la bourrache et l'ortie dans les lots O/BO et O/UD, respectivement, a permis de diminuer le taux du MDA par rapport au lot OVA et ainsi diminuer la peroxydation lipidique dans le foie, les érythrocytes et significativement dans les poumons ($p \leq 0,05$). Ce qui peut être dû aux effets protecteurs des molécules antioxydantes (annexe 10) contenues dans les deux plantes contre les dommages causés par les radicaux libres au niveau des membranes cellulaires des érythrocytes, des poumons et du foie lors de la sensibilisation avec l'OVA.

D'autres études ont pu aussi démontrer que le traitement avec certaines plantes médicinales et des antioxydants permet d'atténuer la peroxydation lipidique dans des cas d'asthme expérimental (Tiwari et *al.*, 2014 ; You et *al.*, 2014).

Lorsqu'un état de stress s'installe dans un organisme, ce dernier met en jeu plusieurs systèmes de défense et de lutte tel que le système du glutathion. Ainsi, le GSH est un antioxydant clé qui protège les poumons des altérations dues aux radicaux libres. Étant donné qu'une grande partie du stress oxydatif pulmonaire se produit sur la surface extracellulaire de l'épithélium du poumon, où justement le glutathion est très abondant notamment dans le liquide du revêtement épithélial des voies respiratoires (Kirkham et Rahman, 2006), il joue un rôle principal dans la protection extracellulaire des poumons. Par ailleurs la plupart du glutathion dans la circulation se trouve dans le globule rouge afin de préserver son rôle dans la physiologie de l'oxygène. Le seul autre organe qui a des taux élevés de GSH est le foie (Kirkham et Rahman, 2006).

Récemment les travaux de Migdal (2010) ont mis en évidence une signalisation calcique induite par les allergènes, qui, bien qu'elle ne semble par directement impliquée dans le processus d'activation, est sous le contrôle de l'induction d'ERO. Cette production d'ERO (cytoplasmique et mitochondriale) est associée à une chute du potentiel membranaire mitochondriale et une déplétion en glutathion (GSH) intracellulaire. De plus, ce dernier (au niveau des cellules présentatrices d'antigène) influence la voie de réponse des cytokines Th1 et Th2, et plus précisément, une réduction du GSH inhibe la production des cytokines associées à la réponse Th1 et/ou favorise la production des cytokines associées à la réponse Th2 (Oh et *al.*, 2010).

D'ailleurs, d'après la figure 85, une diminution significative du taux de GSH entre le lot OVA et T est enregistrée qu'au niveau des poumons. Ce qui est en accord avec les résultats de You et *al.*, (2014). D'ailleurs, Al-Afaleg et *al.*, (2011) ont aussi noté une diminution des taux de GSH chez des patients asthmatiques.

En plus du fait qu'il y a une augmentation des ERO, selon plusieurs auteurs, la conjugaison du GSH aux peptides antigéniques pourrait être la voie majeure de leur élimination. On suppose donc que le glutathion a été utilisé pour l'élimination et la détoxification de l'allergène administré, ce qui a engendré une baisse des taux de ce dernier (Misso et *al.*, 2005).

Par contre, lors du traitement des rats sensibilisés à l'OVA avec les deux plantes, une augmentation du taux de GSH est observée. Cette augmentation est significative dans les poumons lors du traitement avec la bourrache ($p \leq 0,05$).

On retrouve dans la littérature, maintes études qui ont abordé le traitement des rats sensibilisés à l'OVA par des antioxydants naturels ou autres, parmi lesquelles une étude phytothérapeutique réalisée grâce à l'extrait de *Tinospora cordifolia* (Tiwari et al., 2014) et une autre (You et al., 2014) qui a abordé l'administration de la vitamine C chez des souris exposés à l'ovalbumine. Toutes ont permis de démontrer que des taux élevés de glutathion ont été relevés chez les souris traitées par rapport à celles exposées seulement à l'ovalbumine. Nous pouvons ainsi déduire que dans notre étude la présence d'antioxydants dans les extraits des deux plantes (particulièrement dans la bourrache) a permis de maintenir des taux élevés de GSH.

On sait que ce dernier protège également la membrane cellulaire de la peroxydation des lipides par l'intermédiaire du GPx (Lee et al., 2010a). En effet, la GPx est une sélénenzyme antioxydante clé qui règle le niveau des ERO par sa capacité de réduire non seulement le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés. De cette façon, cette enzyme parviendrait à protéger les cellules contre les dégâts générés par les agents étrangers comme l'ovalbumine (Bano et al., 2012). Ayant besoin entre autre du glutathion pour fonctionner correctement, la diminution significative ($p \leq 0,05$) du taux de cette enzyme dans les poumons et les érythrocytes enregistrée dans la présente étude serait principalement due à une surproduction de peroxyde d'hydrogène et donc à l'épuisement entre autre du GSH.

Plusieurs études ont montré une diminution de la GPx dans le sérum et les érythrocytes des asthmatiques (Al-Afaleg et al., 2011 ; Misso et al., 1996 ; Mak et al., 2004 ; Sackesen et al., 2008). Effectivement, en cas d'asthme la GPx est essentielle à l'élimination du H_2O_2 et des produits de l'oxydation lipidique, qui sont continuellement générés lors de l'infiltration des leucocytes dans les poumons (Mak et al., 2004). Misso et al., (1996) ont même soutenu que l'activité réduite de cette enzyme dans le sang peut refléter des mécanismes associés à la gravité de la pathogenèse de l'asthme. De plus, comme l'ont jadis signalé d'autres études (Pacheco et al., 1994 ; Al-Afaleg et al., 2011), nous confirmons dans notre présente étude aussi que la diminution de l'activité de la GPx est bel et bien corrélée à la diminution de la GSH et l'augmentation de la peroxydation lipidique.

Ainsi, le traitement avec les plantes permet d'enregistrer une augmentation dans l'activité de la GPx. Cette augmentation n'est significative ($p \leq 0,05$) que lors du traitement

des rats sensibilisés avec l'extrait de BO. Ceci est en accord avec les précédents résultats où nous avons observé une augmentation significative du taux GSH chez le lot traité avec la bourrache pouvant ainsi expliquer l'augmentation de l'activité de la GPx.

Il existe plusieurs autres antioxydants enzymatiques qui sont utilisés par l'organisme afin de lutter contre les ERO. Nous en avons aussi mesuré la variation au cours de notre protocole expérimental. Il s'agit plus précisément de la CAT et la SOD. On rappelle que cette dernière fonctionne comme première ligne de défense contre le stress oxydant et convertie les radicaux superoxydes en peroxydes d'hydrogène. Cette fonction n'est efficace que si son activité est suivie par les actions de la CAT et la GPx, car le peroxyde d'hydrogène produit par la SOD est subséquentement nettoyé par ces dernières (Devaki et *al.*, 2011).

Chez les mammifères, il existe trois SOD qui sont : la SOD cytosolique (SOD1), la SOD mitochondriale (SOD2), et la SOD extracellulaire (SOD3). Cette dernière (dite aussi EC-SOD) est fortement exprimée dans les poumons. Elle est essentiellement associée à la matrice du tissu conjonctif autour des vaisseaux sanguins des poumons, mais se retrouve également à proximité des voies respiratoires et des cellules musculaires lisses vasculaires. Son importante expression autour des voies respiratoires et du muscle lisse suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans les maladies des voies aériennes tel que l'asthme. Bien que sa relation avec l'asthme n'a pas été spécifiquement confirmé, la superoxyde dismutase extracellulaire (EC-SOD) est fortement suspectée d'avoir une fonction importante dans le mécanisme de l'asthme (Kirkham et Rahman, 2010). D'ailleurs une étude a prouvé que l'administration de l'EC-SOD mimétique fait diminuer l'inflammation dans un modèle animal d'asthme (Chang et Crapo, 2002).

Quant à l'augmentation des ERO, elle provoque des modifications biologiques significatives au niveau des protéines et affecte la fonction de la SOD et contribue à la perte de son activité en favorisant le dégagement du Zn de son emplacement actif (Johnson, 2011). C'est d'ailleurs ce que nous observons lors de notre expérimentation. Le taux de la SOD diminue significativement ($p \leq 0,05$) chez les rats exposés à l'ovalbumine (lot OVA) par rapport au taux de la SOD chez les rats témoins dans les poumons. Ce qui est en accord avec l'étude de Benetti et *al.*, (2012) effectuée sur des souris exposées comme nos rats à l'ovalbumine. Dans une autre étude, Mak et *al.*, (2004) ont aussi observé une diminution de la SOD dans les poumons des asthmatiques et aucune variation significative dans les érythrocytes. Deux autres études ont affirmé que la diminution de l'activité de la SOD est associée à une obstruction du flux d'air, une hyperréactivité et un remodelage bronchique (Comhair et *al.*, 2005a ; Comhair et *al.*, 2005b).

Par contre, le traitement des rats sensibilisés à l'ovalbumine avec la bourrache, augmente significativement ($p \leq 0,05$) l'activité antioxydante de la SOD au niveau pulmonaire. De même, le traitement avec l'ortie provoque une augmentation de l'activité de cette enzyme dans ce même compartiment de l'ordre de 39,02%.

Comhair *et al.*, (2005a) ainsi que Zuo *et al.*, (2013) suggèrent que l'augmentation de l'activité de la SOD est directement associée à une diminution du stress oxydatif, et peut ainsi diminuer les symptômes de l'asthme tels que l'inflammation et l'obstruction des voies respiratoires.

En ce qui concerne la catalase, une diminution de son activité chez les rats sensibilisés comparée à ceux non-sensibilisés peut être observée dans nos résultats, indiquant une légère perte de son pouvoir antioxydant. Ce qui est en accord avec le résultat de Tiwari *et al.*, (2014) sur un modèle d'asthme murin. On observe également une augmentation de l'activité de la catalase chez les deux lots de rats exposés à l'ovalbumine et traités par les deux plantes (O/BO et O/UD) par rapport aux rats du lot OVA, tout comme l'ont rapporté Tiwari *et al.*, (2014) suite au traitement avec *Tinospora cordifolia*.

Cependant, comme ces variations n'ont pas atteint le degré de signification entre les différents lots expérimentaux, ceci peut être dû, comme l'ont signalé Nadeem *et al.*, (2003) ainsi que Mak *et al.*, (2004), au fait que le peroxyde d'hydrogène, formé après dismutation du O_2 par la SOD, ait été éliminé par des taux normaux de catalase et des taux élevés de glutathion, vu que ce dernier représente le principal défenseur contre la toxicité du H_2O_2 . D'ailleurs, aucune corrélation significative n'est enregistrée entre les variations des taux de la catalase et des taux des marqueurs de l'inflammation bronchique (tableau 15).

Par ailleurs, ces derniers se corrèlent positivement avec le MDA et négativement avec le reste des marqueurs du stress étudiés (GSH, GPx, SOD et CAT), c'est à dire que l'augmentation des paramètres de l'inflammation bronchique s'accompagne de l'augmentation du MDA, marqueur de la peroxydation lipidique, et de la diminution du GSH et des enzymes antioxydantes (GPx, SOD, CAT). En effet, lorsque l'inflammation bronchique s'intensifie et par conséquent le recrutement des cellules inflammatoire augmente, il s'accompagne par l'augmentation du taux des ERO, provoquant un état de stress oxydatif. Ce qui explique une peroxydation lipidique élevée et la diminution d'antioxydants tels que le GSH, GPx, SOD et la CAT.

Au niveau des sites de l'inflammation, les cellules inflammatoires telles que les éosinophiles sont capables de générer les ERO qui contribuent aux altérations tissulaires et

aux réactions inflammatoires. De plus, les cellules épithéliales pulmonaires sont connues pour produire des ERO en réponse à différents stimuli environnementaux. Ces ERO oxydent les phospholipides membranaires induisant des altérations de ses fonctions comme le transport et la perte de sa fluidité (Lee et *al.*, 2010a).

Ainsi, la régulation du taux des ERO durant l'inflammation permettrait de contribuer au traitement des maladies inflammatoire pulmonaires. Nos résultats ont permis de constater une diminution significative du recrutement des cellules inflammatoires lors de l'utilisation des extraits de bourrache et d'ortie (lot O/BO et O/UD) par rapport au lot OVA, chez lequel l'augmentation est significative.

Dans notre présente étude, les lots de rats O/BO et O/UD chez lesquels l'asthme expérimental a été provoqué puis traité par des extraits aqueux de bourrache et d'ortie, respectivement, a permis de constater une nette amélioration de l'état de stress oxydatif. En effet, ceci a été apprécié par la diminution de la peroxydation lipidique et l'augmentation des systèmes de défense antioxydant, qui sont plus importante lors de l'utilisation d'extrait de bourrache, de même la corrélation entre les paramètres de stress oxydatif et de l'inflammation bronchique est plus significative lors de l'utilisation de cet extrait (tableau 15).

Ces différents effets constatés entre les extraits des deux plantes peuvent être expliqués par les différences en teneurs de phénols dans nos extraits, chez lesquels nous avons démontré que l'extrait de bourrache a une quantité supérieure en phénols par rapport à celui de l'ortie, ce qui lui a conféré un pouvoir antioxydant plus élevé. D'ailleurs, d'après le tableau 16, nous pouvons noter qu'il existe une corrélation entre les teneurs en phénols/pouvoir antioxydant de nos extraits et leurs effets sur l'inflammation bronchique et le stress oxydatif. Où une teneur élevé en phénols et un fort pouvoir antioxydant sont associés à une diminution de l'inflammation bronchique et celle de l'état de stress oxydatif.

En fin, ces résultats suggèrent aussi que les extraits de *Borago officinalis* et *Urtica dioica* préviennent l'inflammation bronchique médiée par les ERO dans un modèle d'asthme allergique et induit par l'OVA et que l'effet protectif de l'extrait de bourrache est relié principalement a sa capacité de réduire le stress oxydatif généré. Ceci est en accord avec des études effectuées sur d'autres plantes et/ou d'autres molécules antioxydantes dans un modèle d'asthme murin (Lee et *al.*, 2010a ; Lee et *al.*, 2010b ; Yang et *al.*, 2011) suggérant qu'il existe un lien étroit entre le stress oxydatif et l'asthme et que les mécanismes redox du stress oxydatif dans l'asthme allergique jouent un rôle clé dans la pathogenèse de cette maladie (Jiang et *al.*, 2014) et peuvent être une des voies thérapeutiques prometteuse.

Conclusion

Au terme de notre présente étude, il ressort que l'analyse phytochimique sur les extraits des deux plantes que nous avons choisies, à savoir *Borago officinalis* et *Urtica dioica* a permis l'identification de nombreux composés (une trentaine). Parmi lesquels, certains l'ont été pour la première fois dans la bourrache. En effet, tous les flavonoïdes ainsi que l'acide lithospermique ont été identifiés pour la première fois dans les feuilles de *Borago officinalis*, bien que déjà rapporté dans la famille des Borraginacées. Quant à l'oleuropéine, elle a été rapportée dans notre présente étude pour la première fois dans la famille des borraginacées.

Retenons également que les deux plantes sont très riches en polyphénols, lesquels ont des activités antioxydantes qui contribuent de manière très efficace à la prévention de nombreuses maladies. C'est ainsi que nous avons confirmé ce potentiel thérapeutique dans la pathogénèse du processus inflammatoire asthmatique via un modèle d'asthme expérimental murin. En effet, nous avons étudié, en plus des marqueurs de l'inflammation pulmonaire, quelques autres paramètres contribuant à souligner le rôle du stress oxydatif dans la pathogénèse de l'asthme.

Dans ce contexte, nous avons appréhendé l'inflammation allergique via le dosage de certains marqueurs spécifiques, tels que le MDA, la GSH, la GPx, la SOD et la CAT. Les résultats obtenus suggèrent que le déséquilibre de la balance entre les radicaux libres et les systèmes antioxydants, en faveur des premiers, est l'une des causes principales de l'installation et l'exacerbation de l'asthme allergique. De plus, l'étude histologique démontre clairement une infiltration inflammatoire pulmonaire qui, reflète l'effet cytotoxique local de l'ovalbumine sur les poumons. Ces altérations structurales affectant les fonctions de cet organe augmenteraient par conséquent la gravité de la maladie.

D'autre part, le traitement des rats sensibilisés à l'ovalbumine avec les deux plantes: *Borago officinalis* et *Urtica dioica* traditionnellement utilisés contre l'asthme et l'inflammation s'est avéré efficace pour soulager l'inflammation pulmonaire et ce à travers la diminution du taux de cellules inflammatoires et l'infiltration de ces dernières au niveau pulmonaire. Cet effet est significatif pour l'ortie et de façon plus modéré pour la bourrache.

Ainsi, l'administration des extraits de feuilles de ces deux plantes aide à lutter contre les effets néfastes du stress oxydatif en diminuant la peroxydation lipidique d'une part, et d'autre part, en gardant les taux des systèmes de défenses antioxydants enzymatiques (GPx,

SOD, CAT) et non enzymatiques (GSH) proche de la normale. Cette situation permet de rééquilibrer la balance oxydant-antioxydant et ce grâce à la composition chimique de ces extraits, en particulier l'extrait de bourrache, riche en composés antioxydants.

Cette étude, au final, nous aura permis d'une part de justifier les indications thérapeutiques des deux plantes locales dans l'inflammation bronchique asthmatique. D'autre part, on pourrait envisager la valorisation du potentiel thérapeutique Algérien aux vertus multiples en considérant d'autres plantes médicinales, au vu du savoir-faire acquis permettant de réaliser un screening des plantes médicinales locales et en les testant dans un modèle expérimental d'asthme puisque nous sommes les seules à le faire à ce jour en Algérie et que beaucoup de plantes, telles que la bourrache et l'ortie, n'ont jamais été testées dans un tel modèle.

Nos résultats ouvrent également d'autres perspectives pour compléter notre travail dont certaines sont présentées ci-dessous :

En ce qui concerne les extraits éthanoliques de nos deux plantes, une étude supplémentaire serait nécessaire pour en évaluer directement l'effet soit dans un même modèle d'hyperréactivité bronchique chez les rats Wistar, soit sur des cellules épithéliales bronchiques humaines en culture. A ce titre, nous venons justement de mettre en place au niveau de notre département et plus exactement au sein du Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, une salle de culture cellulaire qui sera destinée très prochainement à l'étude des effets bénéfiques des extraits de plantes médicinales sur des cellules endothéliales humaines soumises à des situations de stress oxydatif.

Ensuite, Du point de vue méthodologique, nous pourrions élargir notre étude en appréhendant le stress oxydant et l'inflammation via des marqueurs moléculaires. En effet, les ROS peuvent induire une réponse inflammatoire en médiant/activant des kinases sensibles au stress, lesquelles activent des facteurs de transcription nucléaires sensibles au redox tels que *nuclear transcription factor K_β* (NFK_β). Ces facteurs de transcription, essentiels pour l'expression de gènes inductibles associés avec les réponses inflammatoires et immunitaires, peuvent facilement être étudiés par la technique du western blot.

Références bibliographiques

- A**ebi, H. (1984). Catalase *in vitro*, *Methods in Enzymol.* 105: 121-126.
- Akbay, P., Basaran, A.A., Undeger, U. & Basaran, N. (2003). In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica*. *Phytother. Res.*, 17: 34-37.
- Al-Afaleg, N.O., Al-Senaïdy, A. & El-Ansary, A. (2011). Oxidative stress and antioxidant status in Saudi asthmatic patients. *Clinical Biochemistry*, in press.
- Allan, K. & Devereux, G. (2011). Diet and Asthma: Nutrition Implications from Prevention to Treatment. *J Am Diet Assoc.*, 111: 258-268.
- Amit, D., Kandharea S., Bodhankara, L., Vikas S. & al. (2013). Anti-asthmatic effects of type-A procyanidine polyphenols from cinnamon bark in ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in laboratory animals. *Biomed & Aging Patho.*, 3 : 23–30.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M. & Celik, S.E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta*, 160: 413–419.
- B**ano T., Kumar N. & Dudhe R. (2012). Free radical scavenging properties of pyrimidine derivatives. *Org Med Chem Lett.*, 2: 34.
- Baena-Cagnani, C.E., Gómez, R.M., Baena-Cagnani, R. & Canonica, G.W. (2009). Impact of environmental tobacco smoke and active tobacco smoking on the development and outcomes of asthma and rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 9 : 136-40.
- Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W. & De Clercq, E. (1992). The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral res.*, 18: 191-207.
- Bandoniene, D. & Murkovic, M. (2002). The detection of radical scavenging compounds in crude extract of Borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH. *J Biochem Biophys Methods*, 53:45–49.
- Belch, J.J. & Hill, A. (2000). Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. *Am J Clin Nutr.*, 71 : 352S-6S.
- Belleau, J.T., Gandhi, R.K., Mc Pherson, H.M. & Lew, D.B. (2005). Research upregulation of CD23 (FcepsilonRII) expression in human airway smooth muscle cells (huASMC) in response to IL-4, GM-CSF, and IL-4/GM-CSF. *Clin Mol Allergy.*, 3: 6.
- Benetti, L.R., Campos, D., Gurgueira, S.A., Vercesi, A.E., Guedes, C.E.V. & al. (2013). Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice *in vivo*. *Euro J Pharma.*, 698 : 463–469.

- Beloued, A. (1998). Plantes médicinales d'Algérie. *Office Des Publications Universitaires*. Alger.
- Beyer, W.F. & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem.*, 161: 559-566.
- Blanc, M., Moinard, C. & Cynober, L. (2005). Monoxyde d'azote. Radicaux libres et stress oxydant. *Lavoisier*. Paris, 25-43.
- Bnouham, M., Merhfour, F.Z., Ziyat, A., Mekhfi, H. & Aziz, M. (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, 74 : 677–681.
- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E. & Saykova, I. (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*). *Revue de génie industriel*, 7 : 35-45.
- Bouaziz, M. & Sayadi, S. (2005). Isolation and evaluation of antioxidants from olives leaves of a tunisia. *Eur J of lipid sci Techn.*, 107: 497-504.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem.*, 72: 248–254.
- Brochaert, W.F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H. & Peumans, W.J.(1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, 245:1100-1102.
- Bulani, V., Biyani, K., Kale, R. & Joshi, U. (2011). Inhibitory effect of *Calotropis gigantea* extract on Ovalbumin-induced airway inflammation and Arachidonic acid induced inflammation in a murine model of asthma. *Int J Curr Bio Med Sci.*, 1:19-25.
- Butcher, J.D. (2006). Exercise-induced asthma in the competitive cold weather athlete. *Curr Sports Med Rep.*, 6: 284-288.
- C**adet, J., D'Ham, C., Douki, T., Pouget, J.P., Ravanat, J.L. & Sauvaigo, S. (1998). Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radic Res.*, 2:541-50.
- Chaabi, M. (2008). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Thèse de doctorat de l'université Mouis Pasteur. Constantine.
- Chang, L.Y. & Crapo, J.D. (2002). Inhibition of airway inflammation and hyperreactivity by an antioxidant mimetic. *Free Radical Biology and Medicine* 33 : 379-386.
- Chaturvedula, V. S. P., & Prakash, I. (2012). Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *Int Cur Pharma J.*, 1:239-242.
- Chrubasik, S., Enderlein, W., Bauer, R. & Grabner, W. (1997) .Evidence for antirheumatic effectiveness of Herba *Urtica dioica* III acute arthritis : a pilot study. *Phytomedicine*, 1:105-108.

- Chua, M., Tung, Y. & Chang, S. (2008). Antioxidant activity for ethanolic extract from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresour Technol.*, 99:1918-1925.
- Comhair, S. A., Ricci, K. S., Arroliga, M., Lara, A. R., Dweik, R. A. & al. (2005a). Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*, 172:306-313.
- Comhair, S. A., Xu, W., Ghosh, S., Thunnissen, F. B., Almasan, A. & al. (2005b). Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *Am J Pathol.*, 166 :663-674.
- Conforti, F. Sosa, S. Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A. & al. (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J. Ethnopharm.* 116 :144–151.
- Congo, M., (2012). Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae). Thèse de pharmacie de l'Université d'Ouagadougou Burkina Faso, 42.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med Chem.*, 1:569-590.
- D**all'Acqua, S. Cervellati, R., Loi, M.C. & Innocenti, G. (2008). Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chem.*, 106: 745-749.
- Damašius, J., Venskutonis, P. R., Kaškonienė, V. & Maruška, A. (2014). Fast screening of the main phenolic acids with antioxidant properties in common spices using on-line HPLC/UV/DPPH radical scavenging assay. *Anal Methods.*, 6:2774-2779.
- De Batlle, J., Garcia-Aymerich, J., Barraza-Villarreal, A., Antó, J.M. & Romieu, I. (2008). Mediterranean diet is associated with reduced asthma and rhinitis in Mexican children. *Allergy.*, 63:1310-1316.
- De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, AI. & Lamuela-Ravent, R.M., (2005). Characterisation and quantification of olive oils by solid phase, HPLC-DAD and HPLC MS/MS. *J Agric Food Chem.*, 53:4331-4340.
- Déclaration de Bâle (2010). Appel à plus de confiance, de transparence et d'échanges au sujet de la recherche sur les animaux. La première conférence de Bâle, La recherche à la croisée des chemins.
- Delattre, J., Beaudoux, J.L. & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier*. Paris, 87-108.
- Devaki, M., Nirupama, R. & Yajurvedi, H.N. (2011). Reduced antioxidant status for prolonged period due to repeated stress exposure in rat. *J Stress Physio. Biochem.*, 7:139-147.
- Dorion, G. (2005). Mécanismes et structures impliqués dans l'effet anti-inflammatoire et broncho-relaxant du 1,1 Diméthylphényl 1-4 Pipérazinium. Mémoire en médecine présenté à l'université Laval. Quebec.

Dufresne, C., Ouellet, C., Beaugard, G. & Rioux, A. (2010). La bourrache. Guide de production sous régie biologique, Québec, 26.

Dworski, R. (2000). Oxidant stress in asthma. *Thorax*, 55: S51–S53.

El Gharras, H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *InterJ Food Sci Tech*. 44: 2512-2518.

Elwood, W., Barnes, P. & Chung KF. (1992). Airway hyperresponsiveness is associated with inflammatory cell infiltration in allergic Brown-Norway rats. *Int Arch Allergy Immunol.*, 99:91–7.

Elwood, W., Lotvall, J.O., Barnes, P.J. & Chung, K.F. (1991). Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized brown-Norway rats. *J Allergy Clin Immunol.*, 88 : 951–60.

Encyclopédie Britannica, (2001). Edition Deluxe.

Engelmann, M. D., Hutcheson, R. & Cheng I. F. (2005). Stability of ferric complexes with hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysinà, and 3',4'-dihydroxyflavone. *J Agric Food Chem.*, 53 : 2953-2960.

Engler, M.M. & Engler, M.B. (1998). Dietary borage oil alters plasma, hepatic and vascular tissue fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 59: 11-15.

Enquête Nationale Santé -Projet TAHINA-. (2007). Institut National de Santé Publique. (Contrat n° ICA3-CT-2002-10011).

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. & Jungens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 13 : 341.

Fabre, N., Rustan, I., De Hoffmann, E. & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12: 707–715.

Falcone Ferreyra, M.L., Rodriguez, E., Casas, M.I., Labadie, G., Grotewold, E. & Casati, P. (2013). O-glucosyltransferase Identification of a bifunctional maize. *J Biol Chem.*, 288:31678-88.

Farag, M.A., Weigend, M., Luebert, F., Brokamp, G. & Wessjohann, L.A. (2013). Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica* accessions (stinging nettle) based on UPLC–Q-TOF-MS metabolomic profiles. *Phytochemistry*. In press.

Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-115.

- Ferreres, F., Sousa, C., Vrchovska, V., Valentao, P., Pereira, J. & al. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of tronchunda cabbage internal leaves. *Eur Food ResTech.* 222 : 88-98.
- Flohe, L. & Gunzler, W.A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105 : 114–121.
- Fukuda, T., Fukushima, Y., Numao, T. & al. (1996). Role of interleukin-4 and vascular cell adhesion molecule-1 in selective eosinophil migration into the airways in allergic asthma. *Americ J of Res Cell and MolBio.*, 14: 84–94.
- G**ardès-Albert, M. & Jore, D. (2005). Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. Radicaux libres et stress oxydant. *Lavoisier*. Paris, 1-23.
- Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P. & Perceval O. (2003). Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aqua Toxicol.*, 64: 185-200.
- Gilani, A.H., Bashir, S. & Khan, A.U. (2007) Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders. *J Ethnopharmacol.*, 114 : 393-9.
- Giri, M., Swamy, V.B.M. & Jayaveera, K.N. (2012). Evaluation of Nootropic Activity of leaves of *Borago officinalis*. *RJPBCS*, 3: 405-414.
- Girodet P.O., & Tunon de Lara J.M. (2007). Immunoglobulines E et asthme, EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Pneumologie, 6-039-A-44.
- Godard, P., Chanez, P., Bousquet, J., Demoly, P., Pujol, J.L. & Michel, F.B. (2000). Asthmatologie. *Masson*. 2^{ème} édition, 1-18 ; 31-52 ; 165-179.
- Gonzalez-Gallego, J., Garcia-Mediavilla, M.V. & Sanchez-Campos, S. & Tuñón, M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr.*, 104: S15-S27.
- Gouveia, S. & Castilho, P.C. (2011). Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD–ESI–MSn method. *food Chem.*, In press.
- Grevsen, K., Fretté, X.C. & Christensen, L.P. (2009). Content and composition of volatile terpenes, flavonoids and phenolic acids in Greek Oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*) at different development stages during cultivation in cool temperate climate. *Europ J Hort Sci.*, 74 : 193–203.
- Güder, A. & Korkmaz, H. (2012). Evaluation of *in-vitro* Antioxidant Properties of Hydroalcoholic Solution Extracts *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Wallr. and Their Mixture. *Iranian J Pharm Res.*, 11 : 913-923.
- Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicol.* 217:213–220.

Güler, E. R. (2013). Investigation of Chemopreventif Properties of *Urtica Dioica* L., in MCF-7 and MDA 231 Breast Cancer Cell Lines. *The New J Med.*, 30:50-53.

Guo, W., Kong, E. & Meydani, M. (2009). Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr Cancer*, 61:807-10.

Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H. & Hamid, Q. (2011). Role of TGF- β in airway remodeling in asthma. *American J of Resp Cell and Mol Bio.* 44: 12-133.

Harbige, L.S., Layward, L., Morris-Downes, M.M., Dumonde, D.C. & Amor, S. (2000). The protective effects of omega-6 fatty acids in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in relation to transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) up-regulation and increased prostaglandin E2 (PG E2) production. *Clinical Exp Immuno.*, 122:445-452.

Heim, K.E., Tagliaferro, R.A. & Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. *J Nut Biochem.*, 13:572-584.

Hennebelle, T. (2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. Thèse de doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire. Lille, 303.

Henz, B.M., Jablonska, S., Van de Kerkhof, P.C., Stingl, G., Blaszczyk, M. & al. (1999). Double-blind, multicenter analysis of the efficacy of borage oil in patients with atopic eczema. *Br J Dermatol.*, 140: 685-8.

Hmid, I., Elothmani, D., Hanine, H., Oukabli, A. & Mehinagic, E., (2013). Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. *Arab. J. Chem.* In press.

Hoarau, C., Abuaf, N., Bérard, F., Bienvenu, J., Chollet-Martin, S. & al. (2011). Physiopathologie de l'hypersensibilité immédiate (HSI), association des collèges des enseignants d'immunologies. P 3-7.

Hossain, M. A. & Shah, M. D. (2011). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arab. J. Chem.* In press.

Hould, R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *Maloine*, 19-21 ; 225-227.

Izuhara, K., Ohta, S., Shiraishi, H., Suzuki, S., Taniguchi, K. & al. (2009). The mechanism of mucus production in bronchial asthma. *Curr Med Chem.*, 16 : 2867-75.

Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., Lee, N.A. & Lee, J.J. (2007). Eosinophils and asthma. *Curr Allergy and Asthma Rep.*, 7:18-26.

Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A. & Sayadi, S. (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem Biol Interact.*, 176, 88-98.

- Jiang, L., Diaz, P.T., Best, T.M., Stimpfl, J.N., He, F. & Zuo, L. (2014). Molecular characterization of redox mechanisms in allergic asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunol.*, 113:137–142.
- Johnson, M.A., Macdonald, T.L., Mannick, J.B., Conaway, M.R. & *al.* (2011) Accelerated s-nitrosothiol breakdown by amyotrophic lateral sclerosis mutant copper, zinc-superoxide dismutase. *J Biol Chem.*, 276:39872–39878.
- Juma, K.K., Maina, S.G., Muriithi, J.N., Mwangi, B.M. & *al.* (2015). Protective Effects of *Urtica dioica* and Cimetidine on Liver Function Following Acetaminophen Induced Hepatotoxicity in Mice. *J Develop Drugs*, 4:2
- Jung, C.H., Lee, J.Y., Park, J.H., Cho, B.J., Sim, S.S. & Kim, C.J. (2010). Flavonols attenuate the immediate and late-phase asthmatic responses to aerosolized ovalbumin exposure in the conscious guinea pig. *Fitoterapia*, 81: 803–812.
- K**aledaite, R. & Bernatoniene, J. (2011). Investigation of antiradical activity of *Salvia officinalis* L., *Urtica dioica* L., and *Thymus vulgaris* L. extracts as potential candidates for a complex therapeutic preparation. *J Medicinal Plants Res.*, 5 : 6090-6096.
- Kandasamy, R.G.R., Hellermann, S.S., Mohapatra, R.F. & Lockey, A. (2012). Flavonoid-Rich Alcoholic Extract of Leaves of *Achyranthes Aspera* Reduces Inflammation in a Murine Model of Ova- Induced Asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 129 : AB78.
- Kandhare, A.D., Bodhankara, S.L., Singha, V., Mohanb, V. & Thakurdesaib, P.A. (2013) Anti-asthmatic effects of type-A procyanidine polyphenols from cinnamon bark in ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in laboratory animals. *Biomed Aging Pathol.*, 3:23-30.
- Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Gunduz, H. & *al.* (2003). Effects of *Nigella Sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-treated rats. *J Veto Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 50:264-268.
- Kavalali, G. (2003). *Urtica* : therapeutic and nutritional aspects of stinging nettles. *Taylor & Francis*, Série Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles. Londres, New York, 37:83.
- Kay, A.B., Phipps, S. & Robinson, D.S., (2004). A role for eosinophils in airway remodeling in asthma. *Trends in Immunol.*, 25: 477–482.
- Kim, H.R., Lee, D.M., Lee, S.H., Seong, A.R., Gin, D.W. & *al.* (2010). Chlorogenic acid suppresses pulmonary eosinophilia, IgE production, and Th2-type cytokine production in an ovalbumin-induced allergic asthma: Activation of STAT-6 and JNK is inhibited by chlorogenic acid. *International Immunopharmacology*, 10, 1242-1248.
- Kim, K.C., McCracken, K., Lee, B.C., Shin, C.Y., Jo, M.J. & *al.* (1997). Airway goblet cell mucin: its structure and regulation of secretion. *Eur Respir J.*, 10 : 2644-9.
- Kirkham, P. & Rahman, I. (2006). Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology and Therap.*, 111: 476-94.

Kirmizibekmez, H. Altan, H.B., Liktör-Busa, E., Zana, A., Yesilada, E. & Hohmann, J. (2012). Chemical constituents of *Salvia dichroantha*. *Biochem Sys and Eco.*, 42:18-20.

Lake, J.A., Field, K.J., Davey, M.P., Berling, D.J. & Lomax, B.A. (2009). Metabolomic and physiological responses reveal multi-phasic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to chronic UV radiation. *Plant, Cell and Envir.*, 32:1377-1389

Lambert, A.J. & Brand, M.D. (2009). Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol.*, 554: 165-181.

Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G.Y., Liao, J. & Yang, C.S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J of Clin Nutr*, 81: 284S- 291S.

Lee, J., Durst, R.W., & Wrolstad, R.E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J the AOAC Inter.*, 88:1269-1278.

Lee, J., Vogt, T., Schmidt, J., Parthier, B. & Loble, M. (1997). Methyljasmonate-induced accumulation of coumaroyl conjugates in Barley leaf segments. *Phytochem.*, 44:58-592.

Lee, M.Y., Lee, N.H., Seo, C.S., Lee, J.A., Jung, D., Kim, J.H. & Shin, H.K. (2010a). *Alpinia katsumadai* seed extract attenuate oxidative stress and asthmatic activity in a mouse model of allergic asthma. *Food Chem Toxicol.* 48 : 1746-1752.

Lee, N.M., Lee, M.Y., Lee, J.A., Jung, D.Y., Seo, C.S. & al. (2010b) Anti-asthmatic effect of *Sanguisorba officinalis* L. and potential role of heme oxygenase-1 in an ovalbumin-induced murine asthma model. *Inter National J of Mol Med.*, 26: 201-208,

Leemans, J., Kirschvink, N. & Gustin, P. (2009). Le point sur l'asthme félin et ses modèles expérimentaux. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 153 : 187-210.

Lenoir, L. (2011). Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Thèse de doctorat en sciences de la vie. Université de Clermont-Ferrand. P9.

Leopoldini, M., Russo, N. & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 125: 288-306.

Lin, L., Liu, L., Chiang, L. & Lin, C. (2002). *In vitro* anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phyto Res.*, 16: 440- 444.

Macheix, J.J., Fleuriet, A. & Sarni-Manchado, P. (2006). Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. *Lavoisier*. Paris, 1-28.

Machlin, L.J. & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, 1 : 441-445.

- Mahajan, S.G. & Mehta, A.A. (2011). Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a guinea pig model of asthma. *Eur J of Pharm.*, 650:458–464.
- Mak, J.C.W., Leung, H.C.M., Ho, S.P., Law, B.K., Lam, W.K. & al. (2004). Systemic oxidative and antioxidative status in Chinese patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 114:260-266.
- Manis, J.P. Tian, M. & Alt, F.W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.*, 23: 31-39.
- Martínez-Huélamo, M., Tulipani, S., Estruch, R., Escribano, E. Illán, M. & al. (2015). The tomato sauce making process affects the bioaccessibility and bioavailability of tomato phenolics: A pharmacokinetic study. *Food Chem.* 173 : 864-872.
- Mausser, P. J. House, H., Jones, H., Correll, G. & al. (2013). Pharmacological characterization of the late phase reduction in lung functions and correlations with microvascular leakage and lung edema in allergen-challenged Brown Norway rats. *Pulmon Pharmacol & Therap.*, 26 : 677-684.
- Mayol , K., Cavalié, F. & Davoust-Nataf, N. (2013). Immunité et vaccination. Actualisation continue des enseignants en science ACCES. <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunite-et-vaccination/immunite-innee-barrieres-naturelles-et-reaction-inflammatoire/les-mediateurs-de-l2019inflammation> ; mis à jour : 04/02/2013 ; Date de consultation 12/2014.
- Meharzi, S., Boumendjel, A., Bouchair, N., Belgharssa, A. Messarah, M. (2014). La sensibilisation aux pneumallergènes domestiques et sévérité de l'asthme chez les enfants asthmatiques à Annaba (Algérie). *Revue Française d'Allergo.*, 54 : 239-240.
- Mena, S., Ortega, A. & Estrela, J. M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mut Res - Gen Toxicol and Envir Muta.*, 674 : 36-44.
- Meral, L. & Kanter, M. (2004). Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on selected mineral status and hematological values in CCl₄-treated rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 96: 263-270.
- Mhamdi, B., Wannes, W.A., Chahed, T., Ksouri, R. & Marzouk, B. (2010a). Phenolic compounds and antiradical scavenging activity changes during *Borago officinalis* Stalk Leaf development. *Asi. J.Chem.* 22, 6397-6402.
- Mhamdi, B., Wannes, W.A., Sriti, J., Jellali, I., Ksouri, R. & Marzouk, B. (2010b). Effect of harvesting time on phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Borago officinalis* seed extracts. *Ind Crops and Prod.*, 31 :1–4.
- Michel, T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*), Thèse doctorale en chimie analytique-phytochimie. Université d'Orléans. p168.
- Migdal, C. (2010). Etude des événements précoces impliqués dans l'activation des cellules dendritiques humaines induite par le thimerosal : rôle du stress oxydant. Thèse de doctorat de l'université Claude Bernard, Lyon.

- Milcent, J.P. (2011). Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. <http://www.tela-botanica.org/wikini/florecoste/>; mis à jour : 10/06/2011. Date de consultation : 15/01/15.
- Minshall, E.M., Leung, D.Y., Martin, R.J., Song, Y.L., Cameron, L. & *al.* (1997). Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 326-33.
- Misso, N.L., Brooks-Wildhaber, J., Ray, S., Vally, H. & Thompson, P.J. (2005). Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J.*, 26:257-64.
- Misso, N.L., Powers, K.A., Gillon, R.L., Stewart, G.A. & Thompson, P.J. (1996). Reduced platelet glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in atopic asthmatic patients. *Clin Exp Allerg.*, 26: 838-847.
- Mittman, P. (1990). Randomized, double-blind study of freeze-dried *Urtica dioica* in the treatment of allergic rhinitis. *Planta Med.*, 56:44-47.
- Moura, C.T.M., Bezerra, F.C., Moraes, I.M., Magalhães, P.J.C. & Capaz, F.R. (2005). Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited by nifedipine and niflumic acid in rat trachea *in vitro*. *Clinic and Exp Pharmacology and Physio.*, 32 :1119-1123.
- Murphy, K.M. & Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.*, 2: 933-944.
- N**adeau, S. (1994). Exercice, asthme et froid étude des mécanismes cellulaires et moléculaire. Maitrise en science de l'activité physique. Université du Québec à trois-rivières. Québec, P3-6
- Nadeem, M.S., Sunil, K., Chhabra, M.D., Anbrin Masood, M.S., Hanumanthrao, G. & Raj, J. (2003). Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *Allergy Clin Immunol.*, 111 :72-78.
- Nafti S., Taright, S., El Ftouh, M., Yassine, N., Benkheder, A. & *al.* (2009) Prevalence of asthma in North Africa: the Asthma Insights and Reality in the Maghreb (AIRMAG) study. *Respiratory Med.*, 103: S2-S11.
- Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E. & Marnett, L.J. (2003) Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*, 278: 31426-33.
- O**ber, C. & Hoffjan, S. (2006). Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun.*, 7: 95-100.
- Oh, P.S., Lim, K. & Lim, K.T. (2010). Phytoglycoprotein (75 kDa) inhibits expression of interleukin-1b stimulated by DEHP in human mast cells. *Cell Biochem Funct.* 28: 352-359.

- Okoko, B.J., Burney, P.G., Newson, R.B., Potts, J.F. & Shaheen SO. (2007). Childhood asthma and fruit consumption. *Eur Respir J.*, 29:1161- 1168.
- Ollivier, D., Boubault, E., Pinatel C., Souillol S., Guérère M. & Artaud J. (2004). Analyse de la fraction phénoliques des huiles d'olive vierges. *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique*, 965 :169-196.
- Orcic, D., Franciškovic, K., Bekvalac, M., Svircev, E., Beara, I. & al. (2014) . Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.*, 143 : 48–53.
- Ozen, T. & Korkmaz, H. (2003). Modulatory effect of *Urtica dioica* L. leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in nuee. *Phytomedicine*, 5:405-415
- P**acheco, Y., Cheria Sammari, S., Chabannes, B., Gormand, F. & al. (1994). Perturbations des métabolismes lipidique et oxydatif dans les processus inflammatoires immuno-allergiques. *Rev. f. Allergol.*, 34 : 117-126.
- Pankaj, G., Wadibhasme, M. Ghaisas, M.M. & Prasad, A. (2011). Thakurdesai Anti-asthmatic potential of chrysin on ovalbumin-induced bronchoalveolar hyperresponsiveness in rats. *Pharmac Bio.*, 49 : 508–515.
- Park, H-J., Lee, C-M., Jung, I-D., Lee, J.S., Jeong, Y.I. & al. (2009). Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *Inter Immunopharm.*, 9:261-267.
- Perestrelo, R., Lu, Y., Santos, S.A.O., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P. & al. (2012). Profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MSn: Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chem.*, 135: 94-104.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoïds as antioxidants. *J Natural Prod.*, 63:1035-1042.
- Pokorny, M., Yanishlieva, J. & Gordon, N. (2001). Antioxidants in food: practical applications. *Cambridge: Woodhead Publishing Limited*. New York, 108-109.
- Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochem.* 269:337-341.
- Price, M.L., Van Scoyoc, S. & Butler, L. G. J. (1978) *Agric Food Chem.*, 26, 12-13.
- Procházková, D., Boulová, I. & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoïds. *Fitoterapia*, 82 : 513-523.
- Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G-J.E. & Komaitis M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.*, 95:664-671.

Qujeq, D., Davary, S., Moazzi, Z. & Mahjoub, S. (2011). Effect of *Urtica dioica* leaf extract on activities of nucleoside diphosphate kinase and acetyl coenzyme, a carboxylase, in normal and hyperglycemic rats. *Afr J Pharm and Pharmacol.*, 5: 792-796.

Ra, J., Lee, S., Kim, H.J., Jang, Y.P., Ahn, H. & Kim, J. (2010). Bambusae Caulis in Taeniam extract reduces ovalbumin-induced airway inflammation and T helper 2 responses in mice. *J Ethnopharm.*, 128:241–247.

Randall, C.F., Randall, H., Dobbs, F., Hutton, C. & Sanders H. (2000). Randomized controlled trial of nettle sting for treatment of base-of-thumb pain. *J Royal Soc Medicine*, 93:305-309.

Rama, K., Raju, S., Kumar, M.N.S., Gupta, S., Srinivas T. & al. (2014). Elango5-Aminosalicylic Acid attenuates allergen-induced airway inflammation and oxidative stress in asthma. *Pulm Pharmacol & Therapeutics*, 29 : 209-216.

Ramesh, B. & Pugalendi, K.V. (2006). Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. *Life Sci.*, 79:306-310.

Ramos, C.S. & Kato, M.J. (2009). Hydrolysis of methyl benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* beetle. *J Braz Chem Soc.*, 20 : 560-563.

Redeuil, K., Smarrito-Menozi, C., Guya, P., Rezzi, S. al. (2011). Identification of novel circulating coffee metabolites in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry *J Chromatog.*, 1218 : 4678-4688.

Riehemann, K., Behnke, B. & Schulze-Ostho, K. (1999). Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-KappaB. *Letters*, 442 : 89-94.

Rock, E. (2003). Stress oxydant, micronutriments et sante. Université d'été de Nutrition. Clermont-Ferrand, 35-38.

Sackesen, C., Ercan, H., Dizdar, E., Soyer, O., Gumus, P. & al. (2008). A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. *Allergy Clin Immunol J.*, 122:78-85.

Sahiner, U.M., Birben, E., Erzurum, S., Sackesen, C. & Kalayci, O. (2011). Oxidative Stress in Asthma. *WAO J.*, 4:151–158.

Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C. & Masella, R. (2007). Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.*, 43 : 394-405.

Santos, S.A.O., Freire, C.S.A., Domingues, M.R.M., Silvestre, A.J.D. & Neto, C.P. (2011) Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globules* Labill.Bark by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. *J Agric Food Chem.*, 59: 9386-9393.

- Santos, S.A.O., Pinto, P.C.R.O., Silvestre, A.J.D. & Neto, C.P. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Ind Crops and Prod.*, 31:521–526.
- Sanz, M., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Esteruelas, E. & *al.* (2012). LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *J Mass Spectrom.*, 47:905-918.
- Savova, M., Kolusheva, Stourza, T. A. & Seikova, I. (2007). The use of group contribution method for predicting the solubility of seed polyphenols of *Vitis Vinifera* L. *Journal of the UTCM.*, 42:295-300.
- Schneider, E., Machavoine, F., Pleau, J.M., Bertron, A.F., Thurmond, R.L. & *al.* (2005). Organic cation transporter 3 modulates murine basophil functions by controlling intracellular histamine levels. *J Exp Med.* 202:387-393.
- Shaheen, S.O., Sterne, J.A.C., Thompson, R.L., Songhurst, C.E., Margetts, B.M. & Burney, P.G. (2001). Dietary antioxidants and asthma in adults: Population- based case-control study. *Am J Respir Crit Care Med.*, 164:1823-1828.
- Shahidi, F. & Marian, N. (2003). Phenolics in Food and Nutraceuticals. *CRS Press LLC.*, 1:144–150.
- Shahidi, F. & Naczk, M. (2003). Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton, FL. CRC Press, p 558.
- Siddhuraju, P. & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric Food Chem.* 51: 2144– 2155.
- Silva, D.A., Costa, D.A., Silva, D.F., Souza, M.F.V., Agra, M.F. & *al.* (2005). Flavonoides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo. *Rev Bras Farmacogn.*, 15 :23-29.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I. & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mut Res.*, 579 : 200-213.
- Spahr, A. (2007). Caractérisation des macrophages alvéolaires chez un modèle animal d'asthme allergique. Mémoire en médecine expérimentale. Université Laval. Quebec, P 17-19.
- Strek, M.E. & Leff, A.R. (1997). Eosinophils. *Asthma.*, 1: 399-417.

Tahri A., Yamani, S., Legssyer, A., Aziz, M., Mekhfi, H. & *al.* (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *J Ethnopharmacol.*, 73: 95-100.

- Tarascou, I., Mazauric, J.P., Meudec, E., Souquet, J.M., Cunningham, D. & al. (2011). Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESI-MS. *Food Chem.* 128 : 802-810.
- Temann, U-A., Prasad, B., Gallup, M.W., Basbaum, C., Ho, S.B. & al. (1997). A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. *Amer J Respiratory Cell and Mol Bio.*, 16: 471-478.
- Testai, L., Chericoni, S., Calderone, V., Nencioni, G., Nieri, P. & al. (2002). Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) root extracts: *in vitro* and *in vivo* pharmacological studies. *J Ethnopharmacol.*, 105-109
- The Global Asthma Report, (2014). *Global Asthma Network* Auckland, New Zealand.
- Théron, P. & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Systèmes antioxydants endogènes. Radicaux libres et stress oxydant. *Lavoisier*, Paris, 87-111.
- Théron, P. & Denis, B. (2005). Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote : effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. In Delattre J, Beaudeau, JL, Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier*, Paris, 114-167.
- Tita B., Faccendini, P., Bello, U., Martinoli, L. & Bolle, P. (1993). *Urtica dioica* : pharmacological effect of ethanol extract. *Pharmacol Res.*, 27 : 21-22.
- Tiwari, M., Dwivedi, U.N. & Kakkar, P. (2014). *Tinospora cordifolia* extract modulates COX-2, iNOS, ICAM-1, pro-inflammatory cytokines and redox status in murine model of asthma. *J Ethnopharmacol.*, 153 :326-37.
- Tomas-Barberan, F.A. & Clifford M.N (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives: nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.*, 80: 1024-1032.

U metsu, D.T., Akbari, O. & Dekruyff, R.H. (2003) Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 112: 480--488.

V alko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J. Izakovic, M., Mazur, M. & al. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160: 1-40.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. & Omah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agri. Food Chem.*, 46 :4113-4117.

Vidari, G., Finzi, P.V. & Bernardi, M. (1971). Flavonols and quinones in stems of *afmomum giganteum*. *Phytochem.*, 10 : 3335-3339.

W ang, H. & Feng, F. (2009). Identification of components in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, photodiode array and fluorescence detectors. *J Pharm Biomed Anal.* 49:1157-1165.

- Wardlaw, A.J., Chung, K.F., Moqbel, R., MacDonald, A.J., & al. (1990). Effects of inhaled PAF in humans on circulating and bronchoalveolar lavage fluid neutrophils. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141 : 386-392.
- Wardman, P. & Candeias, L.P. (1996). Fenton Chemistry: An Introduction. *Radiat Res.*, 145: 523-531.
- Weckbercker, G. & Cory J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-dependent mouse Leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letter*, 40: 257.
- Wegmann, M. (2009). Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma. *Expert Rev Mol Diagn.*, 9 : 85-100.
- Weiss, S.T., Raby, B.A. & Rogers, A. (2009). Asthma genetics and genomics. *Curr Opin Genet Dev.*, 19 : 279-82.
- Wichtl, M. & Anton, R. (2003) Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. *EMInter/ Tec & Doc éditions*, 2^{ème} édition, Paris, 617-9.
- Wollenweber, E., Wehde, R., Dörra M. & Stevens, F. (2002). On the Occurrence of Exudate Flavonoids in the Borage Family (Boraginaceae). *Z Naturforsch C.*, 57: 445-448.
- X**iang-hua, L., Xian-yu, T., Zhang, D., Xu, J-F., Wang, W-Y. & al. (2009). Effects of *Wuwei Dilong* Decoction on Inflammatory Cells and Cytokines in Asthma Model Guinea Pigs. *J Traditional Chinese Med.*, 29: 220-3.
- Y**agi, A., Kabash, A., Okamura, N., Haraguchi, H., Moustafa, S.M. & Khalifa, T.I. (2002). Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. *Planta Med.*, 68: 957-960.
- Yamamoto, H., Zhao, P., Yazaki, K. & Inoue, K. (2002). Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Chem Pharm.*, 50 : 1086-90.
- Yang, E.J., Lee, J-S., Song, B.B., Yun, C-Y., Kim, D-H. & Kim, I.S. (2011). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract from *Lagerstroemia indica* on airway inflammation in mice. *J Ethnopharmacol.*, 136:422– 427.
- Yener, Z., Celik, I., Ilhan, F. & Bal, R. (2008). Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food Chem Toxicol.*, 47 :418-24.
- Yermakov, A.L., Arasimov, V.V., & Yarosh, N.P. (1987). Methods of biochemical analysis of plants. John Wiley and Sons, New York. p. 300.
- You, H. Chen, S., Mao, L., Li, B., Yuan, Y., Li, R. & Yang, X. (2014) The adjuvant effect induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is mediated through oxidative stress in a mouse model of asthma. *Food and Chem Toxicol.*, 71 : 272–281.

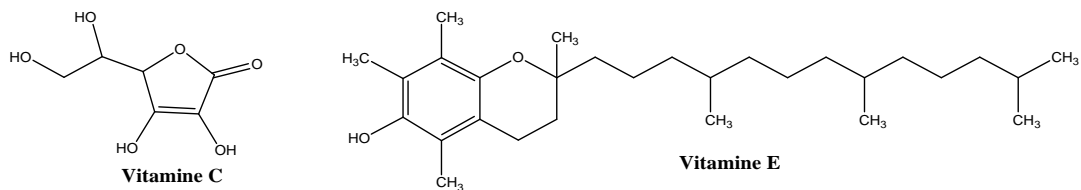
Yuk, J.E., Woo, J-S., Yun, C-Y., Lee, J-S., Kim, J-H. & *al.* (2007). Effects of lactose- β -sitosterol and β -sitosterol on ovalbumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice. *Inter Immunopharmacol.*, 7 : 1517–1527.

Zadernowska, R., Naczkb, M. & Nowak-Polakowska, H. (2002). Phenolic Acids of Borage (*Borago officinalis L.*) and Evening Primrose (*Oenothera biennis L.*). *JAOCS.*, 79:335-338.

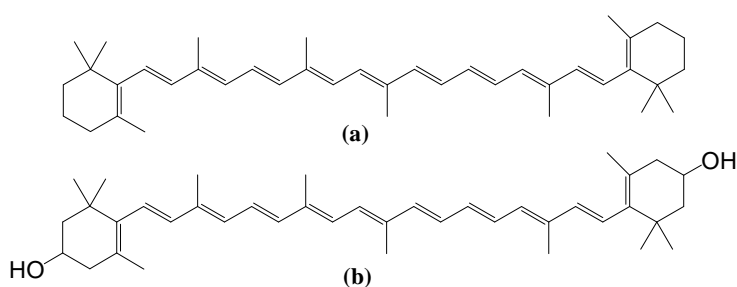
Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64: 555-559.

Zuo, L., Otenbaker, N.P., Rose, B.A. & Salisbury, K.S. (2013). Molecular mechanisms of reactive oxygen species-related pulmonary inflammation and asthma. *Mol Immunol.*, 56: 57-63.

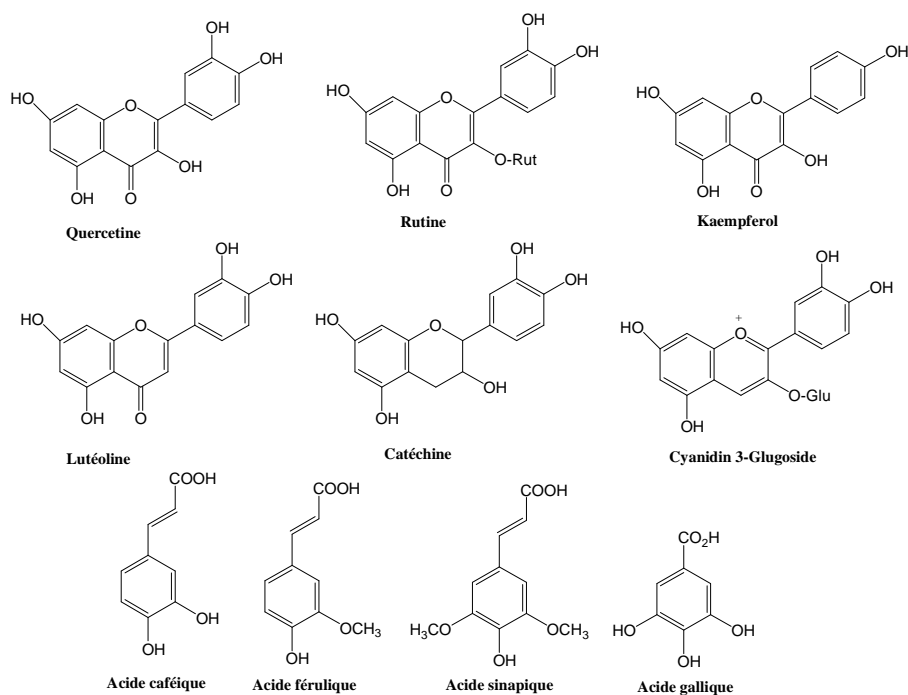
Annexes



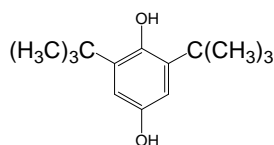
Annexe 1 : Structure des vitamines C et E.



Annexe 2 : Exemple de structure de carotènes : (a) β -carotène (b) xanthophylle.



Annexe 3: Quelques structures de composés phénoliques.



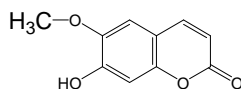
Annexe 4 : Structure du BHT.

Annexe 5 : Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment de l'ONAB (Office Nationale des Aliments de Bétails) de Bejaia.

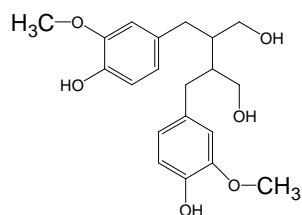
Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Calcaire	9	0.9
Cellulose	10	1.0
Minéraux	10	1.0
Vitamines	10	1.0

Annexe 6: Détermination de la dose d'extraits administrés aux rats.

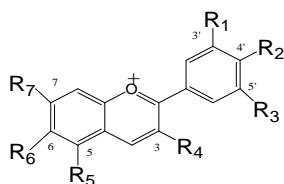
Le but du travail a été de tester l'extrait utilisé traditionnellement selon Beloued (1998) ; la préparation de la tisane de bourrache et d'ortie est de 60g dans 1Litre d'eau en utilisant la méthode décrite dans le chapitre matériels et méthodes. La dose a été déterminée en calculant la moyenne de tisane bue par rapport à la moyenne du poids des rats par jour et exprimé en g tisane/Kg PC rats/jr.



Annexe 7 : Structure de la scopolétine.



Annexe 8 : Structure du *secoisolariciresinol*.



Annexe 9 : Structure des anthocyanidines.

Annexe 10 : Quelques activités biologiques connues des composés identifiés.

N° des tab. et des composés	Nom du composé	Activité biologique	Références bibliographiques
Acides phénoliques (incluant les dérivés)			
Tableau 10 : 17 Tableau 11 : 7	Acide caféique	Antioxydant	Gülçin, 2006
		Anti-inflammatoire	Grunberger et al., 1988
		Immunomodulateur	Grunberger et al., 1988
Tableau 10 : 4	l'acide p-hydroxyphényl lactique	Anti-inflammatoire	Liu et al., 2014
Tableau 11: 10	Acide férulique	Anti-inflammatoire	Graf, 1992
Tableau 10 : 6	Acide lithospermique	Antioxydant	Damase et al., 2014
Ext. aqueux d'UD (Güler, 2013)	Acide gallique	Antioxydant	Yen et al., 2002 Locatelli et al., 2014
		Anti-inflammatoire	Kroes et al., 1992 Locatelli et al., 2014
		Antiallergique	Kim et al., 2006
Coumarines			
Tableau 11 : 1	Ombélliférone	Antioxydant	Ramesh et Pugalendi, 2006
		Antiallergique	Vasconcelos et al., 2009
Ext. aqueux d'UD (Güler, 2013)	Scopolétine	Antioxydant	Malik et al., 2011
		Antiallergique	Cheng et al., 2012
		Anti-inflammatoire	Ding et al., 2008
Flavanol (incluant glucosides et dérivés)			
Tableau 10 : 12	Catéchine	antioxydant	Higdon et Frei, 2003
		Inhibition of LDL Oxidation	Andrikopolous et al., 2003
		Prevention of Plasma Oxidation	Lotito et Fraga, 1998
Flavone (incluant glucosides et dérivés)			
Tableau 11 : 14, 15	Apigénine	Antioxydant	Begum et Prasad, 2012
		Anti-inflammatoire	Narayana et al., 2001

Tableau 10: 10	Lutéoline	Antioxydant	Francisco and Resurreccion, 2008
		Vasorelaxant	Narayana et al., 2001
		Anti-inflammatoire	Narayana et al., 2001
Tableau 11 : 6	Baicaléine	Antioxydant	Peng-fei et al., 2013
Flavonol (incluant glucosides et dérivés)			
Tableau 10 : 7, 11	Quercétine	Antioxydant	Francisco et Resurreccion, 2008
		Vasodilatateur	Pérez-Vizcaíno et al., 2002
		Anti-inflammatoire	Kobuchi et al., 1999
		Antiallergique	Narayana et al., 2001
Tableau 10 : 19	kaempférol	Antioxydant	Francisco and Resurreccion, 2008
		Vasodilatateur	Pérez-Vizcaíno et al., 2002
		Anti-inflammatoire	Narayana et al., 2001
		Antialergique	Narayana et al., 2001
Tableau 11: 2	Isohamnétine	Antioxydant	Yokozawa et al., 2002
		Vasodilatateur	Pérez-Vizcaíno et al., 2002
		Anti-inflammatoire	Ahmed et al., 2005
Flavanone (incluant glucosides et dérivés)			
Tableau 10 : 21	Narangénine	Antioxydant	Francisco and Resurreccion, 2008
		Vasorelaxant	Narayana et al., 2001
Tableau 11 : 5	Eriodictyol	Antioxydant	Areiasa et al., 2001
		Vasodialtateur	Ramón Sánchez de Rojas et al., 1999
Anthocyanidines			
Ext. aqueux d'UD (Güler, 2013)		Antioxydant	Yue and Xu, 2008
Séco-iridoïdes			
Tableau 10 : 13	Oleuropéines	Antioxydant	Jemai et al., 2008
		Vasodilatateur	Visioli et al., 1998
Lignanes			
Ext. aqueux d'UD (Güler, 2013)	<i>Secoisolariciresinol</i>	Antioxydant	Prasad et al., 2000
Caroténoïdes			
Ext. aqueux d'UD (Güler, 2013)		Antioxydant	Stahl et Sies, 2003
		Anti-inflammatoire	Cicccone et al., 2013
Stérol			
Tableau 10 : 9	Sitostérol	Antioxydant	Conforti et al., 2008

Annexe 11 : Liste des réactifs chimiques spécifiques utilisés.

Réactifs	Nom complet (code)	Firme
Acide ortho-phosphorique 85%	-----	Sigma Aldrich
BHT	Hydroxy toluène butylé	Sigma Aldrich
Bleu de Coomassie	-----	MERCK
BSA	Bovine Serum Albumine lyophilized	Fluka
DTNB	Acide 5-5'-dithiobis-2-nitro benzoïque	Sigma Aldrich
GSH	Glutathion	Sigma Aldrich
Methionine	L-Méthionine	Biochem. Chemopharma
NBT	Nitro Blue Tetrazolium	Sigma Aldrich
Riboflavine	-----	Biochem. Chemopharma
TBA	Acide thiobarbiturique	Sigma Aldrich
TCA	Acide trichloracétique	Sigma Aldrich

Annexe 12 : solution utilisées pour le dosage des paramètres du stress oxydant et l'étude histologique.

SOLUTIONS	COMPOSITIONS	QUANTITES
Solution de lavage (pH=7,4)	- KH ₂ PO ₄ . - NaCl. - Eau distillée.	- 1,36 g. - 9 g. 1 litre.
Solution de BRADFORD	- Bleu de Coomassie (G-250). - Ethanol 95%. - Acide ortho-phosphorique. - Eau distillée.	- 100 mg. - 50 ml. 100 ml. 1 litre.
Tampon phosphate (pH=7,4)	- Tris 50 mM. - NaCl 150 mM.	- 6,057 g. - 8,775 g.
TCA-BHT	- TCA. - BHT. - Eau distillée.	- 20 g. - 1 g. - 100 ml.
Tris-TBA	- Tris. - TBA. - Eau distillée.	- 0,315 g. - 1, 729. - 100 ml.
Tampon TBS (pH=7,4)	- NaCl 150 mM. - Tris 50 mM. - Eau distillée.	- 4,387 g. - 3,028 g. - 500 ml.
GSH	- GSH. - Eau distillée.	- 0,491 g. - 16 ml.
DTNB	- DTNB. - Eau distillée.	- 5,151 g. - 13 ml.
TCA	- TCA. - Eau distillée.	- 0,4 g. - 40 ml.
H₂O₂ (30V)	- H ₂ O ₂ . - Eau distillée.	- 130 µl. - 1litre.
Bouin alcoolique (100ml)	- Solution d'acide picrique 1% dans l'éthanol à 95%. - Formol. - Acide acétique. - Eau distillée.	- 45 ml. - 26 ml. - 07 ml. - 22 ml.
Alcool acide (Coloration)	- Alcool éthylique à 70%. - HCl.	- 100 ml. - 50 ml.
Eau ammoniacale (Coloration)	- Ammoniaque. - Eau distillée.	- 2 ml. - 100 ml.

Publications
&
Communications scientifiques

Publication

In

Arabian Journal of Chemistry. In press. (impact factor 2014: 3.725)

Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L. leaf extract growing in Algeria

Zemmouri, H., Ammar, S., Boumendjel, A., Messarah, M., El Feki, A. et Bouaziz, M.



ORIGINAL ARTICLE

Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L. leaf extract growing in Algeria

Hanene Zemmouri ^{a,b}, Sonda Ammar ^c, Amel Boumendjel ^{a,b,*},
Mahfoud Messarah ^b, Abdelfattah El Feki ^d, Mohamed Bouaziz ^c

^a Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

^b Laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquées, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

^c Laboratoire d'Electrochimie et Environnement, Ecole Nationale d'Ingénieur de Sfax, BP 1173, 3038 Sfax, Université de Sfax, Tunisia

^d Laboratoire d'Eco-Physiologie Animale, Faculté des Sciences de Sfax, Tunisia

Received 2 August 2014; accepted 24 November 2014

KEYWORDS

Borago officinalis;
Total phenol;
Phenolic profile;
DPPH;
Antioxidant activity

Abstract The aqueous and hydroalcoholic extracts of borage (*Borago officinalis*) leaves from Annaba region (Algeria) were preliminary analyzed for their phenolic profile (total phenolics, total flavonoids, total flavonols, total tannins and total anthocyanins). These extracts were evaluated for their antioxidant properties by different methods such as DPPH radical scavenging, test NBT and total antioxidant activity. The two extracts have exhibited a high antiradical capacity. Indeed, the ethanolic extract showed the lower IC₅₀ values and the highest amount of phenolics

Abbreviations: BHA, butylated hydroxy anisole; BHT, butylated hydroxy toluene; BO, *Borago officinalis*; C, catechin; C-3-G, cyanidin-3-glucoside; DE, dry extract; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; ESI-MS/MS, electrospray Ionization Mass Spectrometry; GA, gallic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; IP, inhibition percentage; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; Mo, molybdate; MS, mass spectrum; NBT, nitroblue tetrazolium; OD, optical density; Q, quercetin; R, rutin; ROS, reactive oxygen species; TBHQ, tert-butyl hydroquinone

* Corresponding author at: Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.059>

1878-5352 © 2014 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Please cite this article in press as: Zemmouri, H. et al., Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L. leaf extract growing in Algeria, Arabian Journal of Chemistry (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.059>

(94.09 ± 1.72 mg gallic acid/g dry extract). Using LC-MS/MS analysis, it was possible to identify phenolic acids, flavonoids, sterol and for the first time oleuropein was identified in the aqueous extract of the plant. The obtained results have demonstrated that phenolic compounds are the major contributor to the antioxidant activity of plants.

© 2014 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Recently, the biological and medical sciences are invaded by a new concept called "oxidative stress", in which the cell cannot control the excessive presence of reactive oxygen species (ROS). ROS such as superoxide anions (O_2^-), hydroxyl radical (OH^\cdot) and nitric oxide (NO) are produced by biological combustion in the respiration process.

Currently, it is well known that although oxidative stress is not a disease in itself, it is potentially involved in many diseases as a trigger or associated with complications during their evolution as in cancer, cardiovascular diseases, inflammatory lung diseases, immune dysfunctions and neurodegenerative disorders. ROS can also cause a change in the organoleptic properties of foods by the oxidative degradation of their constituent lipids (Yamaguchi et al., 2004).

Hence, the balance between antioxidation and oxidation is believed to be a critical concept for maintaining a healthy biological system (Tiware, 2001). So, to prevent or reduce the oxidative stress, sufficient amounts of antioxidants need to be consumed or added to foods.

The antioxidants can be of synthetic or natural origin. Fact, synthetic antioxidants, such as butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ), are widely used in the food industry. Although, they are effective and less expensive than natural antioxidants, some toxic effects have been reported (Choi et al., 2000). Thus, research for a safer and effective natural antioxidant is in progress. Among these natural antioxidants, phenolic antioxidants can be mentioned. Actually, various methods have been used to evaluate the antioxidant properties of phenolic compounds *in vitro* (Antolovich et al., 2002). These compounds are proved to be more potent antioxidants than Vitamins E and C and carotenoids. Besides, they are reported to quench the oxygen-derived and substrate-derived free radicals by donating a hydrogen atom or an electron to the free radical (Wettasinghe and Shahidi, 1999). Phenolic compounds are present in a wide range of vegetables and plants, playing an important role in defense mechanisms (Arici et al., 2014).

Borage (*Borago officinalis* L.) is a herbaceous plant of the Boraginaceae family native to North Africa and widely spread in many Mediterranean countries. In Algeria, this plant is used not only for preparing beverages and salads but also for different medicinal purposes. Over the last years, in spite of being the subject of increasing agricultural interest thanks to its high content of γ -linolenic acid in seed (Mhamdi et al., 2009), to the best of our knowledge, few research studies have been devoted to the investigation of its antioxidant activity. For example, Conforti et al. (2008) have demonstrated the strong antioxidant activity of borage leaves extract. Other research works have reported that the ethanolic extract of defatted seeds possess phenolic acids, antioxidant and free radical scavenging

activities (Mhamdi et al., 2010a). However, the information pertaining to the active components of borage leaves is very scarce. It is worthy to mention that the presence of fatty acids (Ciriano et al., 2009), phenolic acids (Mhamdi et al., 2010b), pyrrolizidine alkaloids (El-Shazly and Wink, 2014), and sterols (Conforti et al., 2008) was previously noticed.

In folk medication, the most of medicinal plants are used by making their aqueous extracts as raw materials but it is important to note that same biomass is more beneficiary if extracted in ethanol rather than water. Therefore, the Algerian borage was preliminarily characterised by comparing the aqueous extract and the ethanol extract through their chemical compositions by using colorimetric methods and mass spectrometry. Furthermore, the antioxidant activity of both extracts of borage was carried out using three methods: 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl radical-scavenging assay (DPPH test), total antioxidant activity by phosphomolybdenum method, and scavenging of superoxide radical (NBT test).

2. Materials and methods

2.1. Plants materials

Fresh entire leaves of *Borago officinalis* (BO) were collected in March 2012 from his natural habitat at the East flank of Mount Edough (facing the Mediterranean Sea) in Sidi Aissa. This semi-urban area, located to the north of the conurbation of Annaba (Latitude: 36° 59'30.84"N/Longitude: 7° 44'52.56" E) is weakly urbanized and with very low traffic. Harvesting was carried out according to good harvesting practices for medicinal plants established by OMS (2003).

2.2. Chemicals

Ammonium molybdate, gallic acid and vanillin were obtained from Biochem, Chemopharma (Cosne Sur Loire, France). All other chemical products used in this study were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, France).

2.3. Extraction procedure

The leaves were washed thoroughly under tap water, air-dried and powdered using electric grinder to obtain a powder.

2.3.1. Aqueous extract

Ten grams of BO leaves powder were boiled with 200 mL of distilled water for 20 min with an occasional stirring. The decoction preparation was then filtered through a muslin cloth followed by filtration with filter paper. The extract was evaporated to one-fifth of its original volume and kept at 4 °C until its use.

2.3.2. Ethanol extract

Dried and powder materials were extracted with 80% EtOH (1:10, w/v) for 24 h, and concentrated under reduced pressure at a temperature of 60 °C in a rotary evaporator.

2.4. Determination of the total phenols

The determination of the total phenolic compounds was performed by means of the Folin-Ciocalteu reagent and the method described by Gargouri et al. (2013). The total phenolic content was expressed as milligrams of gallic acid (GA) equivalent per gram of extract. The total phenolics were carried out by using standard gallic acid curve with least square regression ($y = 0.011x$, $R^2 = 0.990$). The optical density was measured at $\lambda = 765$ nm and carried out using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1800 PC, Japan).

2.5. Total flavonoids contents

The total flavonoids were measured by a colorimetric assay adopted by Bouaziz et al. (2010). One mL aliquot of appropriately diluted sample or standard solution of quercetin was added to a 10 mL volumetric flask containing 4 mL double distilled water (ddH₂O). At zero time, 0.3 mL 5% NaNO₂ was added to the flask. After 5 min, 0.3 mL 10% AlCl₃ was added. At 6 min, 2 mL of 1 M NaOH was added to the mixture. Immediately, the reaction flask was diluted with the addition of 2.4 mL of ddH₂O and thoroughly mixed. The absorbance of the mixture –pink color– was determined at 510 nm compared to control water. The total flavonoid contents are expressed as mg quercetin (Q) equivalents/g of extract ($Y = 0.008x$, $R^2 = 0.997$).

2.6. Total flavonols content

The content of flavonols was determined by the method of Yermakov et al. (1987). A standard curve of rutin was performed by mixing 2 mL of different concentrations of methanolic solutions of rutin with 2 mL of AlCl₃ (20 mg/mL) and 6 mL of sodium acetate (50 mg/mL). The absorbance was measured after 2.5 h at 440 nm. The same procedure was followed for 2 mL of plant extracts (3.5 mg/mL). The total flavonols were expressed as dry extract mg/g rutin equivalents (R). For rutin, the curve absorbance against concentration was described by the equation ($y = 0.085x$, $R^2 = 1$).

2.7. Total tannins content

The total tannins content in the plant extracts were determined according the method of Bouaziz et al. (2008). 50 μ L of the extract was added to 3 mL vanillin/methanol (4%). After stirring, 1.5 mL concentrated HCl was added. The absorbance was read at 500 nm after 15 min. The total tannin contents are expressed as mg catechin equivalent (C)/g of dry extract ($y = 0.005x$, $R^2 = 0.988$).

2.8. Total anthocyanins content

The total anthocyanins are water-soluble pigments. The total anthocyanins were estimated by a pH differential method (Lee et al., 2005). The absorbance was measured in

spectrophotometer at 520 nm and at 700 nm in buffers at pH 1 and 4.5, using a molar extinction coefficient of cyanidin-3-glucoside of 29,600.

The results of the equation were expressed as milligrams of cyanidin-3-glucoside equivalents per g of extract after the calculation of the following formula:

$$A \times MM \times DF \times 1000 \\ \epsilon \times d$$

where A is the absorbance calculated by the way: $(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}=4.5}$; MM is molecular mass of cyanidin-3-glucoside; DF is the dilution factor; ϵ is the extinction coefficient; d is the thickness of a curve.

2.9. LC-MS/MS analysis

LC-UV-MS/MS analyses were performed as described by Kite et al. (2007) on a Thermo Scientific System consisting of an Accela U-HPLC unit with a photodiode array detector and an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer fitted with an electrospray source. The following parameters were employed throughout all MS experiments: for electrospray ionization with positive ion polarity the capillary voltage was set to 3.5 kV, the drying temperature to 350 °C, the nebulizer pressure to 40 psi, and the drying gas flow to 10 l min⁻¹. The maximum accumulation time was 50 ms, the scan speed was 26,000 m/z s⁻¹ (ultra scan mode) and the fragmentation time was 30 ms.

Chromatography was performed on 5 μ L sample injections on to a 150 \times 3 mm i.d., 3 μ m, Luna C18 (2) column (Phenomenex). A 400 μ L, min linear mobile phase gradient of methanol/water/acetonitrile + 1% formic acid was used, changing from 0:90:10 to 90:0:10 over 20 min, followed by an isocratic phase for 5 min and then a column wash phase and equilibrium of column for 3 min before the next injection.

The ESI source of the mass spectrometer was operated in both positive and negative modes under the recommended manufacturers conditions for the mobile phase parameters. The orbitrap mass analyser was set to scan in the range of m/z 200–2000 at 30,000 resolutions in one polarity while the linear ion-trap analyser performed MSⁿ analyses on the most abundant ions in both polarities using an ion-isolation window of +2 m/z and relative collision energy of 35%. For the accurate mass analyses of product ions generated by MS² in the ion trap, the ions were scanned by the orbitrap at 7000 resolutions. Negative mode ESI was utilized since the phenolic compounds in question ionize better in this mode. The acidification of the LC mobile phase allows the best separation as the hydroxyl groups on compounds are kept in their acidic form, thereby increasing their retention on the column and decreasing peak broadening.

2.10. Determination of antioxidant activity

2.10.1. DPPH radical scavenging assay

The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical-scavenging effect was evaluated following the procedure described in a previous study (Bouaziz et al., 2008). In succinct terms, the aliquots (50 mL) of various concentrations of the compound tested were added to 5 mL of a 0.004% methanol solution of DPPH. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was read against a blank at 517 nm. The inhibition of free radicals DPPH in percentage (IP%) was calculated in the following way:

$IP\% = [(A_{blank} - A_{sample})/A_{blank}] \times 100$, where IP is the inhibition percentage; A_{blank} is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test extract), and A_{sample} is the absorbance of the test compound. The results are expressed as IC_{50} , the amount of antioxidant necessary to decrease the initial concentration of DPPH by 50%. The lower IC_{50} values indicate a higher antioxidant activity. The synthetic antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid were used as positive controls.

2.10.2. Scavenging of superoxide radical (NBT test)

The scavenging activity toward the superoxide radical (O_2^-) was measured in terms of inhibition of O_2^- generation. The nitroblue tetrazolium (NBT) reacts with the superoxide anion to give the oxidized NBT (tetrazolyl) which becomes formazan, water insoluble and purple (Yagi et al., 2002).

The reaction mixture consisted of 100 μ L of samples, phosphate buffer, riboflavin, EDTA and NBT. The absorbance was read at 580 nm after illumination under UV lamp for 10 min against blank. The blank contained all the components except NBT. The percentage of inhibition was calculated using the following formula: $IP\% = [1 - (OD_{sample}/OD_{100\%})] \times 100$. Where IP is the inhibition percentage, OD_{sample} is the absorbance of the test compound and $OD_{100\%}$ is the absorbance of the control reaction. The tested compound concentration, which provided 50% inhibition (IC_{50} , expressed in μ g/mL), was calculated from the graph plotted inhibition percentage against the extract concentration.

2.10.3. Total antioxidant activity by phosphomolybdenum method

The total antioxidant capacity was based on the reduction of ammonium molybdate (IV) to ammonium molybdate (V) by the sample and the subsequent formation of green phosphate/Mo (V) compounds with a maximum absorption at 695 nm (Prato et al., 1999).

0.1 mL of each sample (10 mg/mL) was mixed with the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate in 100 mL). The tubes were incubated in boiling water bath at 95 °C for 90 min. Then the solution was cooled to room temperature and absorbance was read at 695 nm with spectrophotometer against blank. The total antioxidant activity results were the ratio between the positive control and the extracts under study. The results are expressed in μ g positive control (BHT or Vit C)/ μ g extract, after the calculation of the following relation: x positive control (μ g/mL) / x extract (μ g/mL).

2.11. Statistical analysis

Three replicates of each sample were used for statistical analysis. Data were expressed as mean \pm standard error (SE). In all experiments, data were subjected to correlation coefficient in Excel 2007.

3. Results

3.1. Extracts yields and polyphenolic contents

The aqueous and ethanolic extracts from *Borago officinalis* leaves yielded approximately 45% and 4.83% respectively.

The results for the quantitative determination of the total phenols, flavonoids, flavonols, tannins and anthocyanins contents of the aqueous and ethanolic extracts of *Borago officinalis* leaves are showed in Table 1. The Statistic analysis of phenolic content revealed a high significant difference ($P < 0.001$) between the aqueous (35.48 ± 2.70 mg GAE/g DE) and ethanolic extract (94.09 ± 1.72 mg GAE/g DE).

The total flavonoid content in the ethanolic extract (37.65 ± 3.93 mg QE/g DE) was higher than that in the aqueous extract (20.79 ± 2.95 mg QE/g DE). It varied significantly ($P < 0.05$) from one another. Moreover, no significant differences ($P \geq 0.05$) were found in the total flavonols, representing 11.39 ± 1.56 mg rutin/g DE for the ethanolic extract and 10.88 ± 0.18 mg/g DE for the aqueous extract.

Tannins and anthocyanins were also estimated in extracts. According to Table 1, the tannins and anthocyanins are present in low amounts in both extracts. In fact, while the variation of the tannins amount was significant ($P < 0.05$) between both extracts, that of anthocyanins amount was of no significance ($P \geq 0.05$).

3.2. Tentative identification of the chemical compounds by LC-MS/MS analysis

Using the LC-MS/MS apparatus, it was possible to identify the majority of the compounds of the analyzed plant. All the detected molecules were characterized by studying their fragmentation obtained by ESI-MS/MS in positive and negative mode, as well as by using the literature data and optionally by injection standards under the same chromatographic conditions. The identities, retention times, UV characteristics, and observed molecular and fragmented ions for individual components are presented in Table 2.

Table 1 Polyphenols, flavonoids, flavonols, tannins and anthocyanins content in the ethanol and aqueous extracts of *Borago officinalis*.

Samples	Total polyphenols (mg GAE/g DE)	Flavonoids (mg QE/g DE)	Flavonols (mg R/g DE)	Tannins (mg C/g DE)	Anthocyanins (mg C-3-G/g DE)
<i>Borago officinalis</i>					
Ethanol extract	94.09 ± 1.72	37.65 ± 3.93	11.39 ± 1.56	6.67 ± 0.69	0.27 ± 0.09
Water extract	35.48 ± 2.70	20.79 ± 2.95	10.88 ± 0.18	3.14 ± 0.60	0.09 ± 0.01

Values are mean \pm SE of three replicates for each estimation.

The statistical differences between the ethanolic and aqueous extracts are shown in table as significant (*) or very high significant (****).

Table 2 Metabolites identified in the leaf extracts of *Borago officinalis* using LC-MS/MS.

No	peak	RT (min)	UV (nm)	Formula	Extract	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺	MS/MS	Tentative identification
1		1.33	256	C ₁₇ H ₂₂ O ₃	a,b	273		175, 123	m-Geranyl-p-hydroxybenzoic acid
2		2.86	325	C ₁₆ H ₁₆ O ₉	b	335		317, 179, 161	Caffeoyl shikimate acid
3		5.39	362	C ₉ H ₁₀ O ₄	a,b	181		166,153, 139	Syringaldehyde
4		6.37/7.11	280, 340	C ₈ H ₈ O ₃	a	181/183		137, 113, 109	p-Hydroxyphenyl lactic acid
5		7.53	222, 298	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀	a	/387		225, 207	Sinapic acid hexoside
6		10.25	254, 286, 308sh	C ₁₆ H ₁₆ O ₁₀	a	717		537, 519, 493	Lithospermic acid B
7		10.38	260, 355	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	a	/465		303, 273, 257	Quercetin-3-O-glucoside (Isoquercetin)
8		10.54	280	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	b	/197		179, 153, 138	Dihydroferulic acid
9		10.58	210	C ₂₀ H ₃₀ O	a	413/		Nd	β-Sitosterol
10		11.65/11.40	253, 268, 345	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	a	447/449		285, 257, 243, 213, 199	Luteolin 7-O-glucoside
11		12.25/11.41	256, 352	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	a	447/449		301, 283, 257, 179, 151	Quercetin-3-O-rhamnoside (Quercetin)
12		12.55	278	C ₁₅ H ₁₀ O ₁₁	a	451		289, 179, 165, 137	Catechin-7-O-glucoside
13		11.79	254	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₂	b	539		377, 307, 275	Oleuropein
14		12.96	268, 337	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	a	431		311, 269, 207	Apigenin 8-C-glucoside (Vitexin)
15		13.03	270, 334	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	a	431		311, 269, 251, 207	Apigenin 6-C-glucoside (isovitexin)
16		13.67	278	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	b	207		164, 134, 104	3,4-Dimethoxycinnamic acid
17		14.96	322	C ₈ H ₈ O ₄	a	/181		178, 134	Caffeic acid
18		16.25	242, 270sh, 343	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	b	327		285	Luteolin 7,3',4'-trimethyl ether
19		16.26	266, 353	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	b	327		285	Kaempferol 3,7,4'-trimethyl ether
20		19.83	280	C ₁₄ H ₂₁ N ₄ O ₇	b	291		273, 231, 145	Coumaroyl hydroxyugmatine
21		20.07	283, 340	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	a,b	433/435		271	Naringenin O-hexosides
22		20.48	256	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	a,b	/301		139	4-Hydroxybenzoic acid glucoside

(a): Identified in aqueous extract; (b) identified in ethanolic extract; sh: should; nd: not defined.

As regards the aqueous extract, 11 constituents were identified (Table 2). For example, compound **4** with a [M-H]⁻ ion at *m/z* 181 was identified as a p-hydroxyphenyl lactic acid. Its spectrum revealed the typical fragmentation of its constituents groups, with fragmentations at *m/z* 137 and 109, due to the loss of -COO and -CO groups, respectively, as previously described (Santos et al., 2010). The identification of compound **13** as Oleuropein was performed by LC-MS as well as by the analysis of UV spectra. The mass spectrum ESI-MS showed a pseudo-molecular ion at *m/z* 539 of the fragments tuned with the image of the fragmentation ion at *m/z* 377, emanating from the cleavage of the glycosyl link. Besides, the ion at *m/z* 307 is explained by the loss of a C₈H₈O fragment (Caruso et al., 2000), while the fragment at *m/z* 275 can be estimated from the rearranged fragments (De la Torre-Carbot et al., 2005) (Fig. 1).

In the ethanol extract of *Borago officinalis*, 15 compounds were detected (Table 2). For example, the mass spectrum in the negative mode of compound **10** showed a base peak [M-H]⁻ *m/z* 447 and an aglycone ion at *m/z* 285. The loss of 162 amu from the intermediate ion is due to the loss of glucose. The λ_{max} of the UV spectrum at 253, 268, 345 nm suggests that is luteolin 7-O-glucoside. The compound **11** gives ion [M-H]⁻ *m/z* 447 corresponding to the base peak in the negative mode spectrum. In MS², the fragment ion *m/z* 301 [M-H-146]⁻ brought about the indication of a rhamnoside and its O-glycosidic linkage. The UV spectrum gave birth to maxima at 256 and 352 nm pointing to a quercetin-type flavonol (Michel, 2011). Other peaks were observed in the same spectrum at *m/z* 283, 257, 179 and 151. The loss of a water molecule gave an ion at *m/z* 283. The retrocyclization of ion *m/z* 301 generated an ion at *m/z* 179, which lost a molecule of carbon monoxide (CO) to give ion at *m/z* 151. In addition, *m/z* 301 lost 28 amu and an ion corresponding to *m/z* 257 was generated. This suggests that it could be a quercetin 3-O-rhamnoside (quercetin) (Fig. 1).

A negative ion mass spectrum of compound **12** showed [M-H]⁻ *m/z* 451 and an aglycone ion at *m/z* 289 in MS² (Fig. 1). Besides, the MS² spectrum exhibited fragments at *m/z* 179, 165 and 137. According to (Chua et al., 2008) catechin (*m/z* 289) was detected in the negative mode and a peak with low intensity *m/z* 137 [M-H-152]⁻ resulted from a retro-cyclization; type Retro Diels-Alder (RDA). The loss of 3,4 dihydroxy-phenyl and catechol generated fragments at *m/z* 165 and *m/z* 179, respectively (Fig. 2). This suggests that compound **12** with 278 maxima UV spectrum is catechin-7-O-glucoside.

The mass spectrum shows a monopic MS¹ [M-H]⁻ at *m/z* 431 in negative mode. The MS² spectrum also showed a lower intensity peak at *m/z* 413, corresponding to the loss of a water molecule (H₂O) and another at *m/z* 362 corresponding to [2M-H]⁻. The MS² spectrum had a peak at *m/z* 311 obtained by the loss of 120 amu (C-glycoside) and another corresponding to the loss of a hexosyl (162 amu) at *m/z* 269. The ion peak *m/z* 269 was fragmented into a peak at *m/z* 251 (loss of 18 amu) and another at *m/z* 207 (loss of 44 amu). These suggestions along with the maxima UV spectrum show that compound **14** is vitexin (apigenin 8-C-glucoside).

The elected compound **15** gave a mass spectrum identical to that reported for vitexin with the presence of an intense ion *m/z* 431 and several fragments (*m/z* 311, 269 and 207), suggesting that it could be identified as isovitexin.

Equally, the compounds in Table 2 were identified by comparing HPLC retention times, UV spectra and mass spectra with the data obtained from standard in-house libraries.

3.3. Antioxidant activity

To screen the antioxidant properties of the samples, several chemical and biochemical assays were performed: scavenging

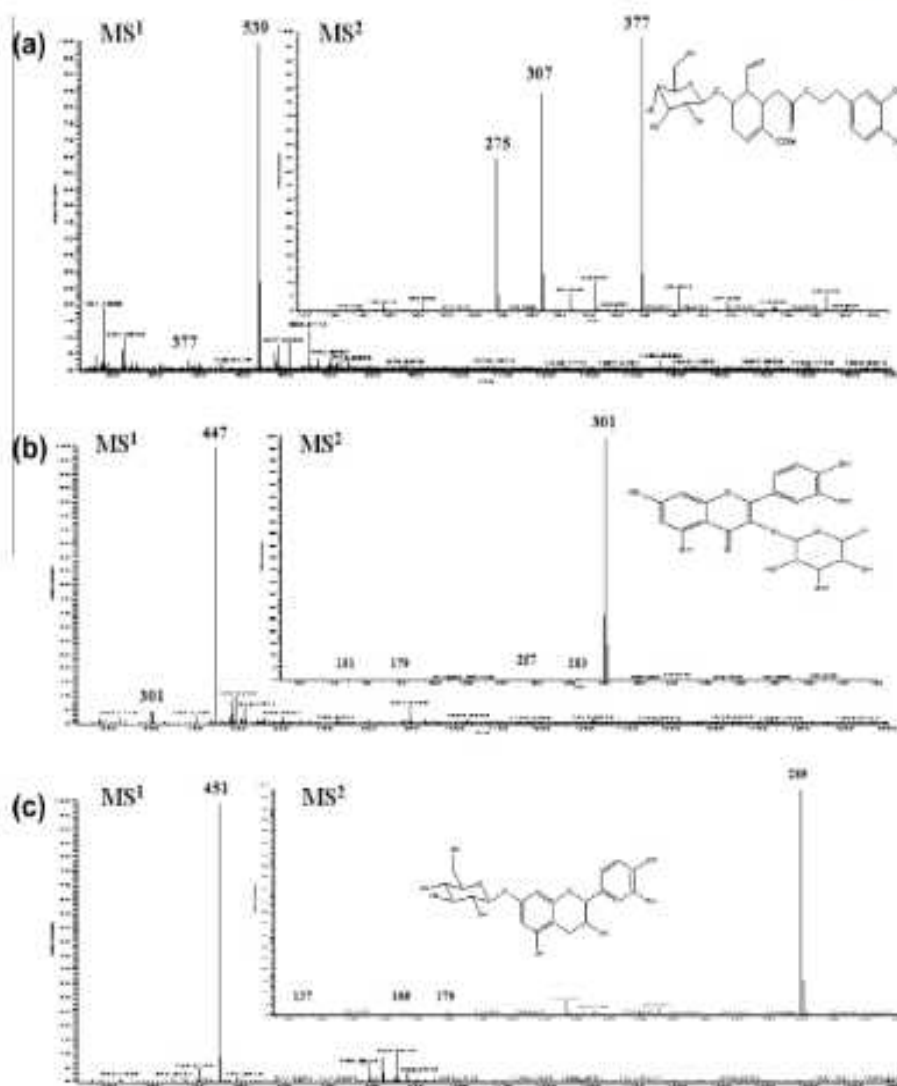


Figure 1 (a) Chromatogram of ion at m/z 539 in the negative ion mode full MS spectra and MS2 spectra. (b) Chromatogram of ion at m/z 447 in the negative ion mode full MS spectra and MS2 spectra. (c) Chromatogram of ion at m/z 451 in the negative ion mode full MS spectra and MS2 spectra.

activity on DPPH radicals, total antioxidant activity and scavenging of superoxide radical (NBT test).

The antioxidant activities of the investigated plant extracts were compared with two antioxidant, BHA and ascorbic acid, which were used as reference standards.

3.3.1. Free radical scavenging activity

The DPPH antioxidant activity of the extracts indicates their ability to dispose of hydrogen atoms. The free radical scavenging potency of the samples is presented in Table 3. As illustrated, the ethanolic extract of *Borago officinalis* was found to exhibit the highest radical scavenging ($92.85 \pm 3.07 \mu\text{g/mL}$). The IC_{50} of BHT and ascorbic acid was $22.5 \pm 0.62 \mu\text{g/mL}$ and $3.14 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$, respectively. The DPPH radical scavenging activity of the tested samples was in the order: ascorbic acid > BHT > ethanolic extract > aqueous extract.

The Statistic results have revealed a high significant difference ($P < 0.01$) of the DPPH antioxidant activity

between ethanolic and aqueous extracts. Therefore, there is a high difference ($P < 0.01$) between the standards and the ethanolic extract and a very high difference ($P < 0.001$) between the standards and the aqueous extract.

3.3.2. Scavenging of superoxide radical (NBT test)

The antioxidant activity was also determined by the inhibition of the oxidation of NBT, i.e., by inhibiting the formation of superoxide anion O_2^- . The scavenging of superoxide radical estimated by NBT test of the extracts is shown in Table 3. The ethanolic extract has shown higher antioxidant activity ($175.73 \pm 0.60 \mu\text{g/mL}$) than BHT ($189.27 \pm 6.23 \mu\text{g/mL}$) and aqueous extract ($346.25 \pm 3.52 \mu\text{g/mL}$), but lower than that of ascorbic acid ($167.47 \pm 1.40 \mu\text{g/mL}$).

Statistically, a high significant difference ($P < 0.01$) of the antioxidant activity between the ethanolic and aqueous extracts is detected. Moreover, the antioxidative capacity of BHT reveals no significant differences ($P \geq 0.05$) with that

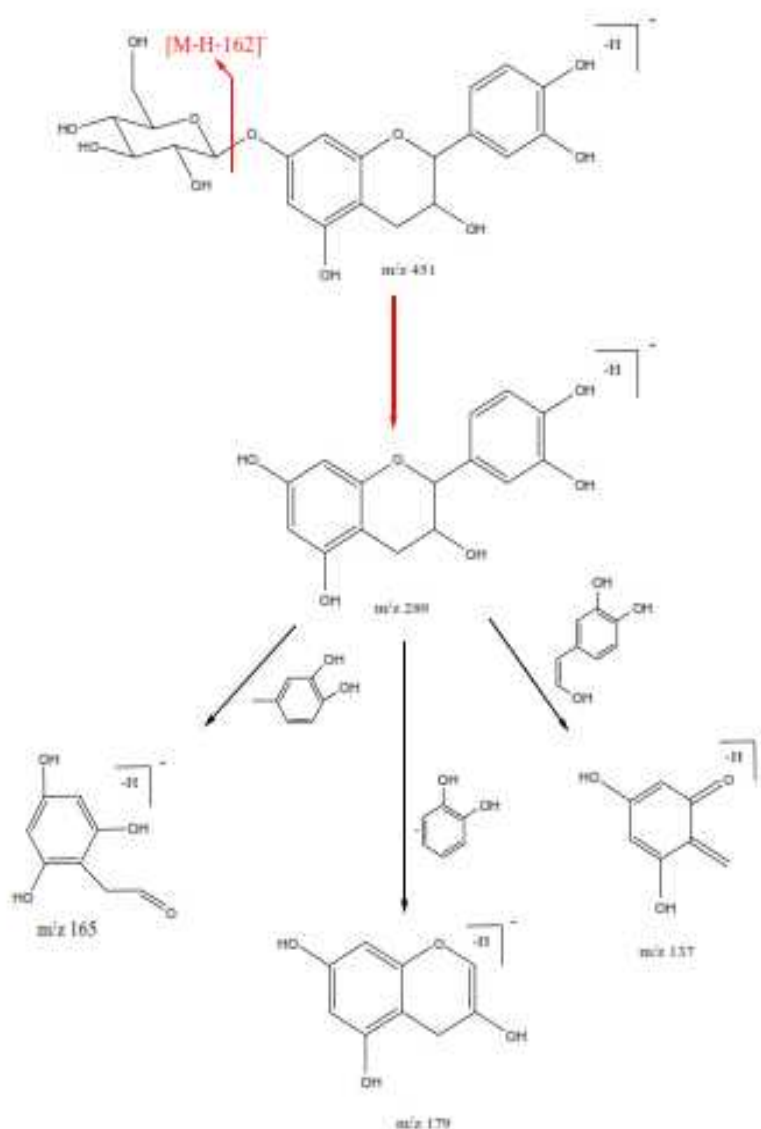


Figure 2 Proposed scheme for fragmentation of $[M-H]^-$ of compound 12.

Table 3 Scavenging capacity of *Borago officinalis* extracts.

Samples	DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	NBT IC ₅₀ (µg/ml)	Total antioxidant activity	
			BHT (mg BHT/mg extract)	Vit C (mg vit C/mg extract)
<i>Borago officinalis</i>				
Ethanol extract	92.85 ± 3.07	175.73 ± 0.60	1.374	0.235
Water extract	130.37 ± 0.99	346.25 ± 3.52	0.887	0.151
BHT	22.5 ± 0.62	189.27 ± 6.23	-	-
VIT C	3.14 ± 0.36	167.47 ± 1.40	-	-

Values are mean ± SE of three replicates for each estimation.

Only the statistical differences between the ethanolic and aqueous extracts are shown in table as significant (†) or high significant (**).

of ethanolic extracts. However, it shows a high significant difference ($P < 0.01$) with that of aqueous extracts. Besides, ascorbic acid shows a very high difference ($P < 0.001$) in both extracts.

3.3.3. Total antioxidant activity

Table 3 shows that the total antioxidant activity of ethanolic extract of *Borago officinalis* is higher than BHT with a ratio of 1.37. While the aqueous extract has a lower activity.

compared with two positive controls, the magnitude of values for the successive extracts shows a similar trend in NBT test and total antioxidant activity.

4. Discussion

The increasing interest in the search for natural alternatives for synthetic antioxidants has led to the antioxidant evaluation of a number of plant sources. In the present study, *Borago officinalis* extracts are used as a potential source of bioactive compounds. To achieve this purpose, the chemical composition and antioxidant activity of the aqueous and ethanolic extracts of borage were investigated.

The data presented in this study demonstrate that the extracts of *Borago officinalis* possess antioxidant and free radical scavenging activities. This suggests that the investigated leaf extracts of borage could also exert protective effects *in vivo* against oxidative and free radical injuries occurring in different pathological conditions.

The antioxidant activity of plant extracts is usually linked to their phenolic content. For that reason several research studies have evaluated the relationships between the antioxidant activity of plant products and their phenolic content. In some studies, a correlation between them was found (Velioglu et al., 1998). In this study, the findings have shown a relationship between the antioxidant activity and total phenolic content. This agrees well with the idea that the phenolic compounds have a key role in free radical scavenging and/or reducing systems. Nevertheless, these results must be interpreted with caution as the method used for estimating the total phenolic content has weak selectivity because the Folin-Ciocalteu reagent reacts positively with different antioxidant compounds (phenolic and non phenolic substances) (Que et al., 2006).

The ethanolic extract has been shown to have higher total polyphenolic contents and antioxidant capacity than aqueous extract, probably due to the polarity and good solubility for phenolic components in ethanol (Siddhuraju and Becker, 2003). The amount of total phenol in the ethanolic extract (94.09 ± 1.72 mg GAE/g DE) was in accordance with the findings of Conforti et al. (2008). But the studied extract exhibited higher flavonoids content and lower antioxidant activity compared to the results reported for Italian Borage by Conforti et al. (2008). Furthermore, the results of DPPH antioxidant activity of ethanolic leaf extract have shown higher activity than those reported by Mhamdi et al. (2010a) for the methanolic leaf extract of Tunisian borage. Such differences could be due to the environmental conditions and geographical distribution, which can modify the constituents of the plant (Hossain and Shah, 2011). Moreover, the antioxidant activities of the plant extracts could be due to the different qualitative and quantitative compositions of their phenolic constituents, from phenolic acids to flavonoids and their derivatives. Consequently, a chemical analysis for the determination of the extract compounds is necessary. Thus, LC-MS was utilized to separate and evaluate the chemical constituents in borage leaves extracts and to assess their antioxidant activity. As shown in Table 2, the phytochemical investigation of borage leaves has led to the identification of 9 flavonoids, 7 phenolic acid derivatives, three phenolic acids, a secoiridoid, a phenolic aldehyde and a sterol.

Among the phenolic acids identified, caffeic acid, p-hydroxyphenyl lactic acid and p-hydroxybenzoic acid were reported in methanolic seeds extract of borage by Zadernowska et al. (2002). In fact, the phenolic compounds were already identified in methanolic leaf extract of borage by Mhamdi et al. (2010a) who have shown the presence of ferulic acid, cinnamic acid, syringic acid, sinapic acid and coumaric acid, which is in agreement with the presence of this phenolic acid derivatives in our extracts. The identification of β -Sitosterol in ethanolic extract is in accordance with the findings by Conforti et al. (2008). Therefore, the oleuropein, known for its presence in olive leaves (Jamai et al., 2008), was reported in the aqueous extract of borage for the first time. Besides, all flavonoids and lithospermic acid were identified for the first time in *Borago officinalis* in the present study, though already reported in Boraginaceae family (Wollenweber et al., 2002; Yamamoto et al., 2002).

The differences in the antioxidant capacity of the extracts could be attributed to the qualitative variability in compounds between them. For instance, the antioxidant activities of phenolic acids and their derivatives, such as esters, depend on the number of hydroxy groups in the molecules (Soobrattee et al., 2005). In addition, it has been reported that the antioxidant potency of flavonoids is roughly proportional to the total number of -OH groups and is positively affected by the presence of an *o*-dihydroxy moiety in the B-ring (Apak et al., 2008). In this regard, the presence of 7 flavonoids (quercetin, isoquercetin, catechin-7-O-glucoside, naringenin O-hexoside, luteolin 7-O-glucoside, vitexin and isovitexin) was reported for the ethanolic extract and three flavonoids (luteolin 7,3',4'-trimethyl ether, kaempferol 3,7,4'-trimethyl ether and naringenin O-hexoside) for the aqueous extract. This partially explains the high antioxidant capacity of the ethanolic extract.

Moreover, a strong antioxidant capacity is also reported for the compounds **6** (Damašius et al., 2014), **9** (Conforti et al., 2008) and **17** (Gülçin, 2006) identified in the ethanolic extract and compound **13** (Jamai et al., 2008) present in the aqueous extract.

It is generally assumed that the ability to act as a hydrogen donor and the inhibition of oxidation are due to the synergism between the antioxidants in the samples, which makes the antioxidant capacity dependant not only on the concentration of phenols, but also on their structure and the interaction between them (Hmid et al., 2013). Thus it is possible to deduce that the antioxidant power of the aqueous extract is lower than the ethanolic extract due to its low content of phenols compared to ethanol extract.

5. Conclusion

In the present study, the high phenolic content and antioxidant potential of Algerian *Borago officinalis* have been demonstrated. The obtained results have shown that the ethanolic extract of borage was highly active against reactive oxygen species. In addition, the LC MS/MS analysis of leaf extracts of *Borago officinalis* showed the presence of 10 flavonoids and a secoiridoid (oleuropein), which are isolated for the first time in borage. The antioxidant activity of the extracts could be attributed to these compounds. Moreover, this research work has revealed that the Algerian borage can be an interesting source of antioxidants, with a potential use in the food and/

or pharmaceutical industries. However, further research would be required.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Algerian and Tunisian Ministries of Higher Education and Scientific Research for the support of this research work via the Algero-Tunisian project (2012-2014). They also wish to extend their thanks to Mrs. Leila MAHFOUDHI, an English teacher at the Sfax Faculty of Science, for having proofread this paper.

References

- Amolovich, M., Prenzler, P.D., Patachides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183-198.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Celik, S.E., 2008. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim. Acta* 160, 413-419.
- Arici, S.E., Kalkas, E., Kaymak, S., 2014. Phenolic compounds of apple cultivars resistant or susceptible to *Venturia inaequalis*. *Pharm. Biol.* 52 (7), 904-908.
- Bouaziz, M., Feki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S., 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chem.* 108, 253-262.
- Bouaziz, M., Feki, I., Ayadi, M., Jemai, H., Sayadi, S., 2010. Stability of refined olive oil and olive pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves. *Eur. J. Lip. Sci. Technol.* 112, 21-24.
- Caruso, D., Colombo, R., Palleti, R., Giavazzi, F., Galli, G., 2000. Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrophotometry (APCI-MS). *J. Agric. Food Chem.* 48, 1182-1185.
- Choi, H.S., Song, H.S., Ukeda, H., Sawamura, M., 2000. Radical scavenging activities of citrus essential oils and their component: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4156-4161.
- Chua, M., Tung, Y., Chang, S., 2008. Antioxidant activity for ethanolic extract from the twigs of *Cinnamomum camphorosmum*. *Bioresour. Technol.* 99, 1918-1925.
- Ciriano, M.G.I., Garcia-Herrera, C., Larequi, E., Valencia, I., Arsoarena, D., Astiasarán, I., 2009. Use of natural antioxidants from lyophilized water extracts of *Borago officinalis* in dry fermented sausages enriched in $n-3$ PUFA. *Meat Sci.* 83, 271-277.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., Loggia, R.D., 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of mediterranean dietary plants. *J. Ethnopharm.* 116, 144-151.
- Damalini, J., Venkatonis, P.R., Kalkoniemi, V., Mariska, A., 2014. Fast screening of the main phenolic acids with antioxidant properties in common spices using on-line HPLC/UV/DPPH radical scavenging assay. *Anal. Methods* 6, 2774-2779.
- De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamsela-Ravent, R.M., 2005. Characterisation and quantification of olive oils by solid phase, HPLC-DAD and HPLC MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4331-4340.
- El-Shady, A., Wink, M., 2014. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the boraginaceae structures, distribution, and biological properties. *Diversity* 6, 188-282.
- Gargouri, B., Ammar, S., Zribi, A., Ben Mansour, A., Bouaziz, M., 2013. Effect of growing region on quality characteristics and phenolic compounds of chemlali extra-virgin olive oils. *Acta Physiol. Plant.* 35, 2801-2812.
- Gülçin, I., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicol* 217, 213-220.
- Hmid, I., Elothmani, D., Hamine, H., Oukabli, A., Mehinagic, E., 2013. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. *Arab. J. Chem.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabj.2013.10.011>.
- Hossain, M.A., Shah, M.D., 2011. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merrremia boroensis*. *Arab. J. Chem.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabj.2011.01.007>.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Feki, I., El Feki, A., Sayadi, S., 2008. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem. Biol. Interact.* 176, 88-98.
- Kite, G.C., Stoneham, C.A., Veitch, N.C., 2007. Flavonoid tetraglycosides and other constituents from leaves of *Siphonobolium japonicum* (Leguminosae) and related taxa. *Phytochem* 68, 1407-1416.
- Lee, J., Duzst, R.W., Wroblestad, R.E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88, 1269-1278.
- Mhamdi, B., Wannas, W.A., Bourguo, S., Marzouk, B., 2009. Biochemical characterization of borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *J. Food Biochem.* 33, 331-341.
- Mhamdi, B., Wannas, W.A., Chahad, T., Kouri, R., Marzouk, B., 2010a. Phenolic compounds and antiradical scavenging activity changes during *Borago officinalis* Stalk Leaf development. *Asian J. Chem.* 22, 6397-6402.
- Mhamdi, B., Wannas, W.A., Sriti, J., Jellali, L., Kouri, R., Marzouk, B., 2010b. Effect of harvesting time on phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Borago officinalis* seed extracts. *Ind. Crops Prod.* 31, 1-4.
- Michel, 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Thèse doctorale en chimie analytique-phytochimie. Université d'Orléans, p168.
- OMS, 2003. Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales, 84 pages.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337-341.
- Que, F., Mao, L., Pan, X., 2006. Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res. Int.* 39, 581-587.
- Santos, S.A.O., Pinto, Paula C.R.O., Silvestre, Armando J.D., Neto, Carlos Pascoal, 2010. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Ind. Crops Prod.* 31, 521-526.
- Siddhuraja, P., Becker, K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2144-2155.
- Soobrattee, M.A., Neerghoen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Baharum, T., 2003. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mut. Res.* 579, 200-213.
- Tiwari, A.K., 2001. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: multiple approach of natural antioxidant therapy. *Curr. Sci.* 81, 1179-1187.
- Veçoglu, Y.S., Marza, G., Guo, L., Omuh, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4113-4117.
- Wetasinghe, M., Shahidi, F., 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chem.* 67, 399-414.

- Wollenweber, E., Webber, R., Dörfl, M., Stevens, Jan F., 2002. On the Occurrence of Exudate Flavonoids in the Borage Family (Boraginaceae). *Z Naturforsch C* 57, 443-448.
- Yagi, A., Kabash, A., Okamura, N., Haraguchi, H., Moustafa, S.M., Khalifa, T.I., 2002. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in *Aloe vera*. *Planta Med.* 68, 957-960.
- Yamaguchi, F., Saito, M., Ariga, T., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., 2004. Free radical scavenging activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2320-2325.
- Yamamoto, H., Zhao, P., Yazaki, K., Inoue, K., 2002. Regulation of lithospermic acid B and obkonnin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Chem. Pharm.* 50, 1086-1090.
- Yermakov, A.I., Aramov, V.V., Yarosh, N.P., 1987. *Methods of Biochemical Analysis of Plants*. Agropromizdat, Leningrad, pp. 127-142.
- Zadernowska, R., Naczek, M., Nowak-Polakowska, H., 2002. Phenolic Acids of Borage (*Borago officinalis* L.) and Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.). *JAOCS* 79, 335-338.

Communication internationale
10^{ème} Congrès Francophone d'Allergologie (impact factor 0,245)
Avril 2015
Paris (France)

Résumé publié
dans la Revue française d'allergologie. Volume 55, Issue 3, Avril 2015, Page 238.

**Effets de l'extrait de feuilles d'*Urtica dioica* sur les
paramètres du stress oxydants dans un modèle murin
d'asthme expérimental.**

Zemmouri, H., Boumendjel, A. et Messarah, M.



Mlle Hanene ZEMMOURI
Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale
Département biochimie
Faculté des sciences
Université Badji Mokhtar
23000 Annaba
Algérie

ATTESTATION DE PRESENTATION DE POSTER

10^e Congrès Francophone d'Allergologie - Paris, 21 au 24 avril 2015

Chère Mlle Hanene ZEMMOURI,

Par la présente, nous attestons de l'affichage du poster Imm-4 au 10^e Congrès Francophone d'Allergologie ainsi que de votre présentation lors de la visite commentée des posters le jeudi 23 avril.

Effets de l'extrait de feuilles d'*Urtica dioica* sur les paramètres du stress oxydant dans un modèle murin d'asthme expérimental

> H. Zemmouri (Annaba), A. Boumendjel, M. Messarah

Numéro d'affichage : Imm-4 - Rubrique : Immunologie

Présidents

A. Magnan (SFA)
J-P. Dume (ANAFORCAL)

Président du conseil scientifique

P. Bonniaud

Comité d'organisation

A. Magnan
J-P Dume
C. Beaudouin
J. Birnbaum
P. Bonniaud
A. Cheynel
A. Didier
J-F Fontaine
E. Gaudet
J. Laurent
A. Tzoupanos

Organisation

Margaux Orange - CFA
20 rue du Mail - 75002 Paris
Tél. +33 (0)1 42 21 15 25
Fax +33 (0)1 42 21 15 55
cfa2015@margauxorange.com
www.congres-allergologie.com

Nous vous prions de recevoir l'expression de nos sincères salutations:

Le secrétariat du CFA 2015

10^e Congrès Francophone d'Allergologie
Palais des Congrès de Paris
2 Place de la Porte Maillot
75017 PARIS



Imm-1

Facteurs modificateurs des angioedèmes héréditaires à bradykinine (AOH): différences selon le type d'angioedème

D. Charignon¹, A. Ghannam¹, F. Defendi^{1,*}, D. Ponard², N. Monner², M. López-Trascasa³, D.A. Monevet-Vuotrin⁴, D. Lauray⁵, K. Djenouhat⁶, O. Fain⁷, S. Cichou⁸, L. Martin⁹, C. Drouet¹

¹ Université Joseph-Fourier, Grenoble, France

² CHU de Grenoble, Grenoble, France

³ Hospital Universitario La Paz, Madrid, Espagne

⁴ CH Épinal, Épinal, France

⁵ CHU de Lille, Lille, France

⁶ Institut Pasteur, Alger, Algérie

⁷ AP-HP Saint-Antoine, Paris, France

⁸ Universität Basel, Bâle, Suisse

⁹ CHU d'Angers, Angers, France

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : sdefendi@chu-grenoble.fr (F. Defendi)

Introduction Les AOH s'associent aux gènes *SERPING1* et *F12*, la sévérité est très variable. La question se pose de l'importance des phénomènes biologiques dans le phénotype clinique: complément, kininogène, enzyme de conversion de l'angiotensine-1, aminopeptidase B, carboxypeptidase N.

Méthodes Les données cliniques et biologiques d'une large cohorte de porteurs d'une mutation (*SERPING1*, n=204; *F12*, n=118) étaient vues rétrospectivement. La sévérité était évaluée: âge de début des manifestations, fréquence et localisation des AO. Le rôle des paramètres était apprécié par régression logistique.

Résultats Les données étaient étudiées dans les 2 groupes *SERPING1* et *F12*. Celles des porteurs de mutation étaient comparées entre elles et à des apparentés non-porteurs, et aux témoins. Le risque de développer une maladie sévère était associé à des valeurs faibles d'activité APP et CPN, et BCA, respectivement pour les porteurs des mutations *SERPING1* et *F12*.

Discussion Nous rapportons la description de la plus importante cohorte de patients AOH porteurs des mutations causales; la sévérité du phénotype clinique dépend de l'efficacité des systèmes de dégradation des kinines. Les enzymes impliquées dans la sévérité des AOH liés à une mutation *SERPING1* ou *F12* sont différentes; cela suggère un rôle différentiel des récepteurs des kinines sur la physiopathologie de ces formes de la maladie, avec des impacts thérapeutiques spécifiques.

Conclusion Ce travail montre l'intérêt de disposer en exploitation de l'AOH des données biologiques sur la production et le catabolisme des kinines. Il argumente l'implication différentielle des récepteurs B2 et B1 dans les types de l'AOH (*SERPING1* versus *F12*).

Déclaration d'intérêts Les auteurs n'ont pas transmis de déclaration de conflits d'intérêts.

Pour en savoir plus

Drouet C, Désormeaux A, Robillaud J, et al. Metallopeptidase activities in hereditary angioedema: effect of androgen propylxylax on plasma aminopeptidase P. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:429–33.

Charigooi D, Ghannam A, Defendi F, et al. Hereditary angioedema with F12 mutation: factors modifying clinical phenotype. *Allergy* 2014;69:1659–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2015.02.081>

Imm-2

Le dosage des IgE spécifiques d'allergène à l'heure de l'accréditation EN ISO 15189 : stratégie proposée par le réseau AllergoBioNet

A. Sarat^{1,*}, C. Lambert², F. Bienvenu³, S. Brabant⁴, P. Nicolas Roland⁵, M.A. Alyanikian⁶, P.A. Apoll⁷, C. Caprion⁸, R. Couderc⁹, B. Evraud¹⁰, D. Jaby¹¹, C. Hémond¹², C. Lainé¹³, M. Lelong¹⁴, D. Mariotte¹⁵, J. Martinet¹⁶, G. Rénier¹⁷, J. Sainne-Laudy¹⁸, T. Tabary¹⁹, E. Treiner²⁰, B. Uring-Lambert²¹, C. Vigneron²², M. Vivinus²³, F. Witthuhn²⁴, J. Vite²⁵

¹ Laboratoire d'immunologie-immunogénétique, hôpital Pellegrin, Bordeaux, France

² Laboratoire d'immunologie, CHU de Saint-Étienne, Saint-Étienne, France

³ Laboratoire d'immunologie, CH Lyon-Sud, Lyon, France

⁴ Laboratoire d'immunologie, CHRU Lille, Lille, France

⁵ UF d'immunologie auto-immunité et hypersensibilités, hôpital

Nichat-Claude-Bernard, Paris, France

⁶ Laboratoire d'immunologie biologique, hôpital Necker-Enfants-Malades, Paris, France

⁷ Laboratoire d'immunologie, hôpital de Rangueil, Toulouse, France

⁸ Laboratoire d'hématologie immunologie, hôpital Ambroise-Paré, Boulogne-Billancourt, France

⁹ Service de biochimie et département d'immunologie, hôpital

Armand-Trousseau, Paris, France

¹⁰ Laboratoire d'immunologie, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

¹¹ Laboratoire de biochimie immunologie, hôpital Delafontaine, CH

Saint-Denis, Saint-Denis, France

¹² Laboratoire d'immunologie, CHU de Nantes, Nantes, France

¹³ Laboratoire immunologie cellulaire-allergologie, hôpital Pouchoullin, Roissy, France

¹⁴ Laboratoire de biochimie, CH Le Mans, Le Mans, France

¹⁵ Laboratoire d'immunologie et immunopathologie, CHU Clemenceau, Caen, France

¹⁶ Laboratoire d'immunologie, CHU de Rouen, Rouen, France

¹⁷ Laboratoire d'immunologie et d'allergologie, CHU d'Angers, Angers, France

¹⁸ Laboratoire d'immunologie, hôpital Dupuytren, Limoges, France

¹⁹ Laboratoire d'immunologie, hôpital Robert-Debré, Reims, France

²⁰ Laboratoire d'immunologie, hôpital Sud, Amiens, France

²¹ Laboratoire d'immunologie, NHC, Strasbourg, France

²² Laboratoire d'immunologie, hôpital Bretonneau, Tours, France

²³ Laboratoire d'immunologie, hôpital Archet 1, Nice, France

²⁴ Service immunologie et inflammation, CHU de Poitiers, Poitiers, France

²⁵ Laboratoire d'immunologie, hôpital de la Conception, Marseille, France

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : aume.sarrat@chu-bordeaux.fr (A. Sarrat)

Introduction La détection et la quantification des immunoglobulines (Ig) E spécifiques d'allergène est une étape importante du diagnostic et du suivi en allergologie. Elle est soumise actuellement, au même titre que l'ensemble des examens de biologie médicale, à l'obligation d'accréditation selon la norme internationale EN ISO 15189. Le réseau des biologistes de l'allergie Allergo-BioNet propose une procédure d'accréditation de dosage des IgE spécifiques d'allergène fondée sur le principe de l'analyse unique utilisant une courbe de calibration commune. Cette stratégie présente un surcoût raisonnable compte tenu de la diversité des allergènes.

Méthodes La validation de méthode selon la norme EN ISO 15189 a été réalisée pour la détermination des IgE spécifiques d'allergène avec la méthode immunofluorescento-enzymatique ImmunoCAP® (Thermo Fisher Scientific, Phadia).

Résultats Les données ont été produites par 25 laboratoires de CH et CHU français. Au total, les IgE spécifiques de 29 allergènes incluant des mélanges, des extraits et des composants moléculaires ont été analysées pour des concentrations comprises entre 0,1 et 100 KU/L.

Discussion Les performances analytiques (répétibilité, reproductibilité et justesse) du dosage des IgE spécifiques respectent les critères de validation de méthode attendus pour les examens de laboratoire automatisés et sont comparables quelles que soient la spécificité allergénique testée, la concentration sérique des IgE ou le laboratoire exécutant l'analyse.

Conclusion Le dosage des IgE spécifiques d'allergène par la méthode immunofluorescento-enzymatique ImmunoCAP® présente des performances analytiques permettant de satisfaire aux exigences de la norme EN ISO 15189 et d'assurer aux prescripteurs et aux patients la fiabilité des résultats fournis, via une stratégie d'accréditation « analyse unique ». La procédure d'accréditation validée par notre étude permet d'éviter un surcoût en réactifs estimé à un demi-million d'euros par automate.

Déclaration d'intérêt Les auteurs n'ont pas transmis de déclaration de conflits d'intérêt.

Pour en savoir plus

Lembert C, Sarrat A, et al. Allergy 2014; doi:10.1111/all.12546.

Sarrat A, et al. Ann Biol Clin 2013;71:325-32.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2015.02.082>

Imm-3

Effet des prébiotiques sur la flore intestinale des rats Wistar

S. Addou*, N. Bensoumer, A. Bessalah, F. Mezmezze, O. Kherrou
Laboratoire de physiologie de la nutrition et de la sécurité alimentaire, Oran, Algérie

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : sabendou@hotmail.com (S. Addou)

Introduction Les prébiotiques sont des composants alimentaires naturels indigestes (oligosaccharides) censés améliorer la santé en influençant favorablement la flore intestinale par la stimulation de certaines bactéries à activité probiotique. Le microbiote intestinal est connu comme étant un élément actif de la physiologie intestinale avec des fonctions métaboliques, de la flore de barrière et de stimulation du système immunitaire intestinal. Notre travail a pour objectif d'étudier l'effet de prébiotique sur la flore intestinale des rats Wistar plus spécifiquement sur les bactéries lactiques.

Méthodes Nous avons utilisé des rats Wistar répartis en deux groupes. Un groupe témoin gavés avec une solution physiologique saline et un autre groupe qui est le groupe expérimental gavés de solution d'oligosaccharide et cela pendant 14 jours.

Résultats Les résultats indiquent qu'il y a une augmentation de la croissance bactérienne dans les fèces et le chyme intestinal chez les rats supplémentés en

prébiotique par rapport à ceux qui ne le sont pas. Selon nos résultats le FOS stimule la prolifération des bactéries lactiques, dans l'intestin qui le fermentent le réduisent à des acides gras à chaîne courte, forment ainsi acetate, butyrate, lactate et propionate.

Conclusion On conclut que les prébiotiques stimulent de manière sélective, au niveau du côlon, la multiplication ou l'activité d'un ou d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte. Les groupes bactériens concernés sont les bactéries lactiques et essentiellement les bifidobactéries.

Déclaration d'intérêt Les auteurs n'ont pas transmis de déclaration de conflits d'intérêt.

Pour en savoir plus

Agnes R. En bref : les prébiotiques pourraient prévenir l'eczéma chez les bébés. Futura Sciences Médecine 2013;45384.

Garner F. Enteric flora in health and disease. J Article Rev 2006;73:5-12.

Inna S, et al. Gut microbiota in health and disease. Physiol Rev 2010;90:859-904.

Winn W, Allen S, Janda W. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6^e ed. Ed. Lippincott Williams & Wilkins;2006:644.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2015.02.083>

Imm-4

Effets de l'extrait de feuilles d'*Urtica dioica* sur les paramètres du stress oxydants dans un modèle murin d'asthme expérimental

H. Zemouri^{1,*}, A. Boumendjel², M. Messarh²

¹ Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, département de biochimie, Faculté des sciences, université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie

² Laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquées, département de biochimie, Faculté des sciences, université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : zemmourihanene2006@yahoo.fr (H. Zemouri)

Introduction Le but de la présente étude est de déterminer si l'administration de l'extrait de *Urtica dioica* (UD) a un effet protecteur contre l'inflammation des voies aériennes dans un modèle murin d'asthme.

Méthodes Vingt et un rats Wistar ont été répartis en : un lot témoin, un lot sensibilisé à l'ovalbumine et un lot sensibilisé à l'OVA et parallèlement traité par l'extrait aqueux d'UD. La numération sanguine des leucocytes et des lymphocytes a été effectuée et les paramètres du stress oxydatif ont été analysés via le dosage du malondialdéhyde [1] et l'évaluation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) [2] et de la catalase (Cat) [3].

Résultats Le pré-traitement des rats sensibilisés à l'OVA avec l'UD a entraîné une réduction de 23,24 % du nombre de GB et une réduction significative ($p \leq 0,05$) des lymphocytes. Ce traitement a également permis d'amoindrir la peroxydation lipidique au niveau des poumons de 14,86 % et d'augmenter les activités de la CAT et de la SOD de 10,87 % et 86,59 %, respectivement.

Discussion L'exposition à l'ovalbumine, qui représente un facteur pro-oxydant, a induit une inflammation et une hyperréactivité bronchique, typiques de l'asthme bronchique humain, ainsi qu'un état de stress oxydatif, de part la diminution de l'activité enzymatique et l'augmentation de la peroxydation lipidique. Cependant, l'utilisation de l'extrait d'UD, riche en antioxydant, diminue l'effet inflammatoire de la sensibilisation et abolit l'augmentation des taux de radicaux libres.

Conclusion La présente étude démontre les effets bénéfiques de l'extrait d'UD sur la pathogenèse de l'inflammation allergique des voies aériennes pouvant ainsi apparaître comme une catégorie supplémentaire d'agents pharmacologiques pour le traitement des maladies pulmonaires allergiques.

Déclaration d'intérêt Les auteurs n'ont pas transmis de déclaration de conflits d'intérêt.

Références

[1] Esterbauer H, et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med 1992;13:341.

[2] Beyer WF, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity. Anal Biochem 1987;161:559-66.

[3] Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol 1984;105:121-6.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2015.02.084>

Communication internationale

26^{ème} Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie de
l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB),
Hammamet, Tunisie. 24-27 mars 2014
Proceeding p 298.

Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de deux extraits de feuilles d'*Urtica dioica*.

Zemmouri, H.; Boumendjel, A. ; Ammar, S.; Bouaziz, M. ; El Feki, A. ; Messarah, M.

ASSOCIATION TUNISIENNE
DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Membre de IUBMB / FASBMB / IUSB / FEBS



TUNISIAN ASSOCIATION
OF BIOLOGICAL SCIENCES

Member of : IUBMB / FASBMB / IUSB / FEBS

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du 25^{ème} forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, tenu à l'hôtel Chich Khan, Tunisie, du 24 au 27 mars 2014, atteste que :

ZEMMOURI HANENE

a participé activement aux journées et a présenté la communication affichée intitulée :

ETUDE COMPARATIVE DES COMPOSES PHENOLIQUES, DU POUVOIR ANTIOXYDANT DE
DEUX EXTRAITS DE FEUILLES D'URTICA DIOICA

Zemmouri, H.; Boumendjel, A.; Annar, S.; Bouaziz, M.; El Feki, A. ; Messarah, M.

Pour le comité d'organisation



Le secrétaire général : Issam SMAALI

IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) - FASBMB (Federation of African Societies of Microbiology and Molecular Biology)
IUSB (International Union of Biological Sciences) FEBS (Federation of European Biochemical Societies)



**ETUDE COMPARATIVE DES COMPOSES
PHENOLIQUES, DU POUVOIR ANTIOXYDANT DE
DEUX EXTRAITS DE FEUILLES D'URTICA DIOICA**

Zemmouri, H.^{1,2}; Boumendjel, A.¹; Ammar, S.²; Bouaziz, M.³; El Feki, A.⁴; Messerah, M.¹

¹Laboratoire de biochimie et de toxicologie
environnementale. Faculté des sciences. Université Badji
Mokhtar ;

²Laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquées.
Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar ;

³Laboratoire d'électrochimie et environnement. Ecole des
Ingénieurs ;

⁴Laboratoire d'éco-physiologie animale. Université de Sfax ;
E-mail :zemmourihanene2006@yahoo.fr tel :
+213774143024

Mots-clés : *Urtica dioica*, DPPH, polyphénols, activité
antioxydante.

L'ortie ou *Urtica dioica* est une des plantes
médicinales les plus intéressantes, vu ses diverses
propriétés toniques, dépuratives, diurétiques, anti-
inflammatoires. Par ce travail nous avons voulu mettre
en évidence une autre de ses propriétés: le pouvoir
antioxydant par le test DPPH, résultant de sa richesse
en molécules actives tels les polyphénols. Ainsi nous
avons effectué une analyse quantitative des phénols,
flavonoïdes, flavanols, orthodiphénols, tanins et
anthocyanes présents dans deux extraits de feuilles : un
extrait à l'éthanol et un extrait aqueux.

Nous avons pu constater que l'extrait
d'éthanol est bien plus riche en polyphénols : $85,11 \pm$
 $0,35$ mg/g d'équivalent acide gallique, orthodiphénols :
 $23,37 \pm 0,87$ mg/g d'équivalent d'acide caféique,
flavonoïdes : $39,96 \pm 2,56$ mg/g d'équivalent
quercétine, flavanols : $10,88 \pm 1,35$ mg/g, d'équivalent
rutine, tanins : $6,29 \pm 1,03$ mg/g d'équivalent catéchine
et en anthocyanes $1,72 \pm 1,22$ mg/g d'équivalent
Cyanidin-3-Glucoside que l'extrait aqueux dont les
résultats des dosages sont respectivement : $30,79 \pm$
 $0,96$ mg d'AG/g d'extrait, $3,11 \pm 0,30$ mg d'AC /g
d'extrait, $22,58 \pm 1,02$ mg de QE/g d'extrait, $6,30 \pm$
 $1,59$ mg de rutine/g d'extrait, $1,05 \pm 0,34$ mg de CA/g
d'extrait et $0,17 \pm 0,03$ mg de C-3-G/g d'extrait.

De plus les résultats du test antiradicalaire DPPH sont
corrélant avec la teneur des extraits en phénols
vu que l'extrait à l'éthanol, le plus riche, possède une
activité antioxydante supérieure à l'extrait aqueux dont
les concentrations inhibitrice sont respectivement IC_{50}
 $= 95,21 \pm 1,71$ µg/ml, $152,34$ µg/ml et en comparaison
avec les résultats obtenus pour les deux étalons (BHT
 $IC_{50} = 22,5 \pm 0,62$ µg/ml et vitamine C $IC_{50} = 3,14 \pm$
 $0,36$ µg/ml) connus pour avoir une très forte activités
antioxydantes, nous pouvons estimer que nos deux
extraits possèdent une activité antiradicalaire très
intéressante.

Communication internationale

Congrès internationales sur les plantes aromatiques et médicinales. CIPAM

2012,

Sidi Bel Abbas, Algérie. 08-10 Mai 2012

Proceeding p267.

Extraction de l'huile essentielle de bourrache

(Borago officinalis).

Zemmouri, H. ; Boumendjel, A. ; Messarah M. et Aouadi S.



ATTESTATION

The CIPAM2012 organizing committee confirms the participation of :

Author : ZEMMOURI H.

Co-authors : A. BOUMENDJEL, M. MESSARAH & S. AOUADI

Title of communication: *Extraction de l'huile essentielle de Bourrache (Borago officinalis)*

Type of communication: *Poster*

at the
International Congress on Aromatic and Medicinal Plants
CIPAM2012
Sidi Bel-Abbes (Algeria), May 8th-10th 2012



Sidi Bel-Abbes, May 10th 2012

Pr. BENHASSANI Hachem

Congress Chair



CIPAM 2012

4th International Congress on Aromatic and Medicinal Plants



BOOK OF COMMUNICATIONS

*University Djillali Liabes
Faculty of sciences
Laboratory of plant biodiversity: conservation and valorization
Sidi Bel-Abbes -Algeria-
May 08 - 10, 2012*

Extraction de l'huile essentielle de Bourrache (*Borago officinalis*)

¹H. Zemmouri, ^{1,2}A. Boumendjel, ^{2,3}M. Messarah & ¹S. Aouadi

¹Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquées, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar d'Annaba, Algérie, zemmourihanene2006@yahoo.fr, amelibis@yahoo.fr

²Laboratoire de Biochimie et de toxicologie environnementale, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar d'Annaba, Algérie, mmessarahd@yahoo.fr

³Laboratoire de Recherche en Ecophysiologie Animale, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar d'Annaba, Algérie

Résumé

La bourrache *Borago officinalis* de la famille des boraginacées est une plante annuelle, très répandue dans la région méditerranéenne et ayant des propriétés aussi bien médicinales, culinaires que cosmétiques. Comme la plupart des plantes médicinales, elle est employée en phytothérapie, la période de la cueillette est très importante pour l'obtention du principe actif dans sa forme.

Ainsi, les feuilles de bourrache ont été cueillies, dans la région d'Annaba à l'est Algérien, à deux périodes distinctes, (au mois de décembre) et au printemps (au mois d'avril). Les huiles essentielles sont extraites par le même procédé d'hydrodistillation suivie des extractions par les solvants.

Après plusieurs essais, l'éther de pétrole a donné le meilleur résultat. Par ailleurs, l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de bourrache a donné des teneurs intéressantes avec une moyenne de 3,49 %. De plus, le rendement au mois de Décembre est de 3,2 % alors qu'en Avril il est de 3,8 %. Ceci confirme que le rendement dépend de la saison de récolte.

Mots-clés : Huiles essentielles, *Borago officinalis*, hydrodistillation, plantes médicinales, extraction par solvants.

1 Introduction

La bourrache *Borago officinalis* est une plante herbacée annuelle à grandes feuilles basales et à fleurs bleues. Originaires du sud de l'Espagne et du Maroc, la bourrache s'est répandue dans tout le bassin méditerranéen et elle est assez commune sur les terrains vagues et les décombres des contrées à climat tempéré, sa floraison intervient de Mars à Mai [1].

Cette plante est utilisée aussi bien à des fins médicinales que culinaire comme la préparation de boissons et salades. En 2002, la bourrache est considérée comme une importante source d'acides gras essentiels notamment l'acide linoléique et l'acide gamma linoléique d'où l'intérêt croissant que lui porte l'agriculture ces dernières années [3].

La bourrache est réputée pour être antispasmodique, antihypertensive, antipyrétique, aphrodisiaque, adoucissante, et traite aussi l'asthme, la bronchite, les crampes, la diarrhée, les palpitations et les affections rénales. En usage externe, les feuilles fraîches écrasées calment la douleur des abcès et des brûlures [1,4].

Une étude a montré que l'huile essentielle des feuilles et de fleurs de bourrache se compose principalement d'aldéhyde (E,E)-2,4-decadienal, d'autres composés sont présents tels que l'alcool dans l'huile essentielle de la feuille et des terpènes monoterpènes hydrocarbures dans celle de la fleur [5].

A notre connaissance, peu d'études ont été consacrées aux activités biologiques de l'huile essentielle, par conséquent l'objectif premier de cette ébauche de travail a été d'extraire l'huile essentielle de feuilles de bourrache obtenue en Algérie et de comparer les rendements de l'huile extraite de plantule et celle extraite de la plante en saison de floraison.

2 Méthodes

2.1 Matériel végétal : La cueillette de la bourrache a été effectuée en Avril et en Décembre 2011 dans la ville d'Annaba en Algérie, selon les bonnes pratiques de récoltes relatives aux plantes médicinales. Les feuilles ont été prises au hasard puis séchées pendant quinze jours à l'air libre et à l'ombre avant utilisation.

2.2 Les étapes de l'extraction : L'extraction se fait en trois étapes : l'hydrodistillation, l'extraction liquide-liquide et le séchage de la phase organique suivie de filtration.

2.2.1 Hydrodistillation : La distillation a été réalisée par ébullition de 5g de matériel végétal broyé avec 100 ml d'eau dans un ballon de 500 ml surmonté d'une colonne reliée à un réfrigérant.

La première goutte de distillat est obtenue aux environs de 95°C et après 2 heures de temps pour les feuilles de bourrache cueillies en Avril et 3h pour celles cueillies en Décembre, on récupère 100 ml de distillat.

2.2.2 Extraction liquide-liquide : En utilisant une ampoule à décanter, le distillat est extrait d'abord par 20 ml d'éther de pétrole et ensuite par 20 ml de chloroforme. Chaque décantation est effectuée en triplicata.

De chaque décantation résulte une phase organique et une phase aqueuse. Il en résulte deux phases organiques : l'une d'éther de pétrole et l'autre chloroformique, alors que la phase aqueuse est récupérée à chaque fois dans l'ampoule à décanter pour subir les décantations suivantes.

2.2.3 Séchage de la phase organique et filtration : Le séchage des phases organiques s'effectue à l'aide du sulfate de magnésium anhydre, ce dernier capte les traces d'eau qui pourraient encore rester dans la phase organique et enfin la filtration à l'aide de pipettes Pasteur et de laine de verre permettra d'éliminer le sulfate de magnésium anhydre.

Une fois séchés les extraits sont placés dans un dessiccateur pour 3 jours au minimum.

Résultats

Après environ 3 jours au dessiccateur, seul l'extrait d'éther de pétrole permet la formation de cristaux. L'extraction des feuilles de bourrache par hydrodistillation suivie d'extractions par l'éther de pétrole donne des résultats assez intéressants que la moyenne des rendements est de 3,49%. On remarque que l'importance du rendement dépend de la période de récolte. Ainsi, le maximum est obtenu au mois d'Avril correspondant au stade de floraison de la bourrache dans la région d'Annaba et il atteint 3,8 %. Alors qu'au mois de Décembre, le rendement est certes moins mais il est encore relativement intéressant vu qu'il atteint 3,2 %.

Communication nationale

6^{ème} journée de méthodologie en recherche clinique. « Maîtrise de la clinimétrie
et bonnes pratiques cliniques» 23 mai 2013,
Université Badji Mokhtar- Annaba, Algérie.

Dosage des polyphénols et étude de l'activité antioxydante de *Urtica dioica*.

Zemmouri, H.; Messarah, A. ; Ammar, S.; El Feki, A. Bouaziz, M.

Université Bouafra - Faculté de Médecine d'Annaba

Unité d'épidémiologie clinique d'Annaba - RESCIF

6ème journée de méthodologie en recherche clinique

« Maîtrise de la clinimétrie et bonnes pratiques cliniques »

23 mai 2013

Attestation de Communication affichée

Le président de la journée atteste que le Pr / Dr: ZEMMOURI. H, MESSERAH. A,
AMMAR. S, FEKI. A, BOUAZIZ. M. a présenté une communication affichée intitulée :
Dosage des polyphénols et étude de l'activité antioxydante de Urtica dioica

Président de la séance

L. Amouza



Stage de formation

Durant l'année universitaire 2012/2013

Au niveau du

laboratoire de physiologie animale, faculté des science –Sfax-

&

l'institut supérieur de biotechnologie –Sfax-



Sfax le 12/03/2013

ATTESTATION

Nous soussignons,

Abdelfattah EL FEKI, Professeur en Physiologie Animale à la Faculté des Sciences de Sfax et Directeur de l'Unité de Recherche 05/UR/09-06,

Mohamed BOUAZIZ, Professeur de chimie des substances naturelles à l'ISBS de Sfax, attestons que Mademoiselle Hanène ZAMMOURI doctorante de la Faculté des Sciences de Annaba en Algérie et encadrée par le professeur Amel BOUMENDJEL, a effectué un stage scientifique de deux mois dans nos laboratoires du 21/01/2013 au 16/03/2013, et ceci dans le cadre de notre projet Tuniso-Algérien 2012-2014,

Au cours de ce stage, Hanène ZAMMOURI :

- A réalisé des extractions avec différents solvants organiques sur des produits secs de deux plantes emmenées avec elle de l'Algérie,
- A réalisé les dosages suivants sur ces extraits : polyphénols, orthophénols, flavonoides, flavonols, tannins et anthocyanes,
- A appliqué sur ces extraits les tests *in vitro* suivants : test DPPH, test NBT, test antioxydant total,

- A réalisé sur certains extraits les CGMS ,
- Les LCMS sont en cours et nous lui enverrons les résultats par la suite,
- A préparé un fascicule qui traite toutes les techniques apprises et maîtrisées par elle au cours de ce stage, les résultats trouvés, les calculs, les corrélations, les interprétations et les conclusions,
- Nous lui avons corrigé et signé ce fascicule,

Cette attestation est délivrée à l'intéressée Hanène ZAMMOURI pour servir et faire valoir ce que de droit.

Pr. Abdelfattah EL FEKI

Pr. Mohamed BOUAZIZ,

