

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Biochimie Physiopathologique



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

***Thème***

**Activité anti-inflammatoire *in vitro* de quelques  
molécules pures d'origine végétale**

Présenté par :

**Harou Aida & YESSAD Narimane**

Soutenu le : **21 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M<sup>me</sup> ABDERRAHIM. S

M<sup>me</sup> DEBBACHE. N

M<sup>me</sup> AIT ALI. D

MAA

MCA

MCA

Présidente

Encadreur

Examinatrice

Année universitaire : **2016 / 2017**

## REMERCIEMENTS

*Avant toute chose, nous tenons à remercier **ALLAH**, le bon Dieu qui nous a donné l'ambitieux, le défi, la santé et le courage pour terminer ce travail.*

*On tient à présenter notre profonde gratitude et nos sincères remerciements au docteur « **DEBBACHE Nadjet** » qui a accepté de nous encadrer et qui nous a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. On vous remercie également pour votre disponibilité, votre soutien, votre gentillesse, votre patience, votre bonne humeur et pour nous avoir laissé une grande liberté tout au long de ce mémoire.*

*Les remerciements vont également à madame « **CHERAFI Nassima** » pour sa disponibilité, son aide scientifique et technique qu'elle nous a apportée.*

*Nos remerciements s'adressent aussi aux membres de jury « **M<sup>me</sup> AIT ALI** » et « **M<sup>me</sup> ABDERRAHIM** » qui nous ont honoré d'avoir accepté de juger notre travail et pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce mémoire.*

*À **M<sup>lle</sup> TABTI Naima** : Vos qualités humaines et scientifiques font de vous une personne d'exception. On vous remercie du fond de cœur, pour tous que vous avez fait pour nous et avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.*

*À tous les enseignants du département de BPC ainsi que tous ceux qui ont participé de près ou de loin de la réalisation de ce travail.*

***Aida & Narimane***

## *Dédicace*

*C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce modeste travail que je  
Dédie*

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de  
Ma vie MAMAN qui m'a toujours guidé avec ces conseils, qui m'a donné la confiance, le  
courage et qui veille sur moi avec ces prières que Dieu la garde pour moi*

*À mon très cher PAPA que j'aime beaucoup qui a toujours cru en moi et as mis à ma  
disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse je te remercie pour ton soutien  
et surtout pour la confiance et la liberté que tu m'as accordé que Dieu vous protège et  
vous garde pour moi*

*À mes frères et sœurs Adel, Fateh, Hanane et Mélissa, ainsi que mon beau-frère Hakim  
pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral ainsi que aux deux anges  
Yanis et Ayoub*

*À mes cousins et cousines surtout Meriem et Nad*

*À tous les membres de ma famille, petits et grands*

*À mon cher binôme et à ma meilleure amie Nary d'être patiente et dépasser toutes les  
circonstances durant ce travail et pour les bons et les mauvais moments partagé ensemble  
pendant 12ans.*

*À toutes mes coupines Ibtissam, Rym, Sabrina et Kanza au nom des souvenirs qu'on a  
partagés ensemble, et a toute la promotion de biochimie physiopathologique*

*À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation*

*.....Aida*



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*À toi **maman**, qui représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites,*

*Je t'aime maman que Dieu te garde pour moi.*

*À mon très cher **père**, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussée et motivé dans mes études tu as été un papa extraordinaire rien ne pourra te remplacer je t'aime papa,*

*que Dieu t'accorde dans son vaste paradis.*

*À mes très chères sœurs : **Souhila, Nassima, Nawel et Sabrina** merci pour vos encouragements et vos soutien moral. J'ai toujours pu compter sur vous quel que soit le moment. Restons unis et soyons à la hauteur de nos parents.*

*À mes adorables neveux : **Mehdi, Racim, Youba et Yani**.*

*À tous mes oncles et tantes des familles **YESSAD** et **KASSA**, merci pour vos encouragements.*

*À mon binôme, ma très chère copine, **Aida***

*Merci pour l'amitié sincère que tu me portes depuis notre rencontre au Cem en 2005, À nos souvenirs, nos bonheurs partagés ensemble merci de m'avoir aidée et supportée dans mes études. Que notre amitié dure toujours.*

*À mes copines surtout les meilleurs, **Ibtissam, Lynda, Rym, Sabrina, Chahinez et Kenza**  
Merci pour tous ces bons moments que l'on a partagés et que l'on continuera de partager.*

***Narimane***



# SOMMAIRE

## Liste des Abréviation

## Liste des Tableaux

## Liste des Figures

Introduction .....	1
--------------------	---

## CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I.1.GÉNÉRALITÉS SUR L'INFLAMMATION.....</b>	<b>2</b>
I.1.1.Définition .....	2
I.1.2.Les facteurs déclenchant l'inflammation .....	2
I.1.3. Types d'inflammation .....	2
I.1.4. Cellules et médiateurs de l'inflammation .....	2
I.1.5. Les anti-inflammatoires .....	5
I.1.6.Implication des lysosomes dans l'inflammation .....	8
I.1.7.Erythrocyte comme modèle d'études de l'activité anti-inflammatoire des substances.....	10

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

<b>II.1-Matérie.....</b>	<b>12</b>
II.1.1-Matériel et équipement.....	12
II.1.2-Réactifs chimiques .....	12
II.1.3- Matériel biologique .....	12
<b>II.2-Méthodes.....</b>	<b>12</b>
II.2.1-Évaluation de l'activité antioxydante .....	12
II.2.1.1. Test de l'activité anti radicalaire par la méthode du DPPH.....	12
II.2.1.2. Test de l'activité anti radicalaire par la méthode d'ABTS.....	13
II.2.2. Étude de la cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges .....	15
II.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	16
II.2.3.1. Hémolysé induite par choc hypotonique.....	16
<b>II.3.Analyse statistique : .....</b>	<b>18</b>

## *CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSIONS*

<b>III.1. Évaluation de l'activité antioxydante.....</b>	<b>19</b>
III.1.1. Résultats du test du pouvoir anti radicalaire par DPPH• .....	19
III.1.2. Résultats du test du pouvoir anti radicalaire contre le radical ABTS <sup>+</sup> .....	22
<b>III.2. Étude de la cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges.....</b>	<b>25</b>
<b>III.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>.....</b>	<b>28</b>
III.3.1.Hémolyse induite par choc hypotonique.....	28
Conclusion et perspectives .....	31
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>32</b>

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

**AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdiens

**AIS** : Anti-inflammatoire stéroïdiens

**ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-9-9sulphonic acide)

**AMPc** : Adenosine monophosphate cyclique

**ATP** : Adenosine triphosphate

**COX** : Cyclo-oxygénases

**DO** : Densité Optique

**DPPH** : Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**GC** : Glucocorticoïde

**GR** : Récepteurs des glucocorticoïdes

**GRE** : Eléments de réponses aux glucocorticoïdes

**HSP 90** : Heat shock proteins (Protéine de choc thermique)

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%

**IL 1 $\beta$**  : Interleukine 1 $\beta$

**IL 6** : Interleukine 6

**IL 8** : Interleukine 8

**LDL**: Low-density lipoprotein

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NF- $\kappa$ B** : Facteur nucléaire -kappa B

**NK**: Natural killer

## *LISTE DES ABREVIATIONS*

**PNN** : Polynucléaires neutrophiles.

**SEM**: Standard error of the mean

**TNF- $\alpha$** : Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$

**UV** : Ultra-violet

## *LISTE DES TABLEAUX*

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Rôle des principaux médiateurs de l'inflammation.	<b>4</b>
<b>II</b>	Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens.	<b>5</b>
<b>III</b>	Les valeurs d'IC50 des molécules testées du test DPPH	<b>21</b>
<b>IV</b>	les valeurs d'IC50 des molécules testées du test ABTS	<b>24</b>

## ***LISTE DES FIGURES***

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	La réponse inflammatoire.	<b>2</b>
<b>02</b>	La biosynthèse des prostaglandines et leurs inhibitions.	<b>6</b>
<b>03</b>	Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.	<b>7</b>
<b>04</b>	Structure du lysosome.	<b>9</b>
<b>05</b>	Dégradation des récepteurs de glucocorticoïdes par le lysosome.	<b>10</b>
<b>06</b>	Structure du DPPH et sa réduction par un antioxydant.	<b>13</b>
<b>07</b>	Formes oxydée et réduite de l'ABTS.	<b>14</b>
<b>08</b>	Principales étapes d'isolement des globules rouges à partir du sang humain.	<b>16</b>
<b>09</b>	Activité réductrice du radical DPPH• par les molécules testées à une concentration de 100ug/ml.	<b>19</b>
<b>10</b>	Courbes représentative de l'activité antioxydante des molécules étudiées à des concentrations de 1,56-200 µg/ml par le test DPPH.	<b>20</b>
<b>11</b>	Activité réductrice du radical ABTS <sup>+</sup> par les molécules testées à une concentration de 100 µg/ml.	<b>22</b>
<b>12</b>	Courbes représentative de l'activité antioxydante des molécules étudiées à différentes concentrations par le test d'ABTS	<b>23</b>
<b>13</b>	Aspect macroscopique de l'effet anti-hémolytique.	<b>25</b>
<b>14</b>	Etude morphologique des globules rouges sur frottis sanguin en absence des composés étudiés (×100).	<b>26</b>
<b>15</b>	Etude morphologique des globules rouges sur frottis sanguin en présence des composés étudiés à différentes concentrations avec un contrôle positif (×40).	<b>27</b>
<b>16</b>	Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par un choc hypotonique aux concentrations de 350 et 500 ug/ml de molécules testées.	<b>28</b>

# *INTRODUCTION*

L'inflammation est un processus physiologique habituellement bénéfique permettant à l'organisme de lutter contre les différentes agressions qui entraînent des altérations tissulaires. Ils enclenchent une cascade de réactions faisant intervenir une séquence d'événements clés tels que la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'altération des membranes (**Mansour *et al.*, 2014; Yougbare-ziebrou *et al.*, 2015**).

Ces événements impliquent, entre autres, l'activation d'élément-clé de l'inflammation, les neutrophiles, qui peuvent initier la réponse inflammatoire via différents mécanismes tels que la libération des médiateurs solubles, des enzymes hydrolytiques et protéolytiques, production des espèces réactives de l'oxygène ainsi que la phagocytose des particules (**Chakravarti *et al.*, 2007**). Cependant lorsque ces mécanismes de régulation ne sont pas bien contrôlés, la réaction inflammatoire pourrait devenir délétère pour les tissus (**Cavaillon, 1993**).

Parmi les organites exposés au stress, les lysosomes, ces derniers dans les cellules non stressées sont en grande partie imperméables aux substrats. En revanche, en condition de stress (l'ischémie, l'anoxie, choc hypotonique ou thermique) il y a une déstabilisation de la membrane ce qui entraîne l'activation des enzymes hydrolytiques et dégagement de leurs contenus dans la cellule qui aurait comme conséquence des dommages cellulaires de type cytolitique (**Weissmann, 1967; Bayne *et al.*, 1985**).

Le traitement de l'inflammation fait appel à plusieurs thérapies parmi lesquelles l'administration d'anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens qui demeurent les classes les plus utilisées dans le monde. Bien qu'étant efficace ces molécules présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leurs utilisations à long terme (**Ndiaye *et al.*, 2006**).

Pour cette raison, la recherche de molécules bioactives d'origine végétale s'avère très utile pour l'amélioration de la santé humaine tout en évitant les effets indésirables des molécules de synthèses.

À cet égard, l'objectif de cette étude consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire de quelques molécules pures d'origine végétale. L'activité anti-inflammatoire est évaluée *in vitro* par le test de la stabilisation membranaire en utilisant le modèle des globules rouges. Des tests complémentaires ont été réalisés pour avoir une idée sur le mécanisme d'action des molécules sélectionnées.

*CHAPITRE I*  
*SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE*

## I.1. GÉNÉRALITÉS SUR L'INFLAMMATION

### I.1.1. Définition

L'inflammation représente l'un des mécanismes les plus importants de défense de l'organisme et peut-être défini comme une réponse normale des tissus vascularisés à divers types d'agressions (**Rather, 1971; Russo-Marie et al., 1998**) qu'ils soient physiques, chimiques ou encore d'origine infectieuse (**Gaziano et Gibson, 2006**). Cette réponse nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie et la cicatrisation du tissu lésé (**Barton, 2008**). La réaction inflammatoire est caractérisée par les quatre signes cardinaux : rougeur, gonflement accompagné de chaleur et de douleur (Figure1) (**Russo-Marie et al., 1998**) (Figure 1).

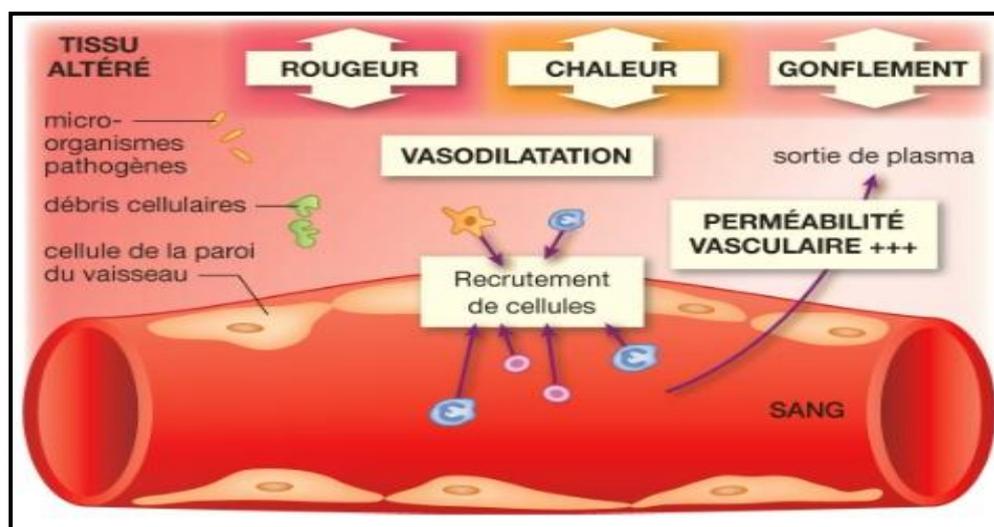


Figure 1 : La réponse inflammatoire (Anonyme<sup>1</sup>).

### I.1.2. Les facteurs déclenchant l'inflammation

Il est possible de classer les agents initiateurs de l'inflammation en deux grandes catégories : Inducteurs exogènes parmi ceux-ci citons les agents chimiques (toxines, acides et bases), infectieux tels que les micro-organismes et physique comme les brûlures, le froid et les rayonnements ionisants dont l'action mécanique entraîne des lésions tissulaires (**Silbemagi et Lang, 2000; Barton, 2008**).

Les inducteurs endogènes regroupent de manière hétérogène tous les signaux produits par un tissu dysfonctionnel ou lésé au cours des agressions dysimmunitaires, défauts de vascularisations provoquées par l'ischémie ainsi que les cristaux formés dans l'organisme (urée, oxalate, phosphate de calcium, cholestérol...etc.) (**Silbemagi et Lang, 2000**).

### I.1.3. Types d'inflammation

#### I.1.3.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réaction brutale et de courte durée qui se produit dans les premières heures qui suivent la lésion tissulaire, caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Ce type d'inflammation s'avère bénéfique dans la mesure où elle permet l'éradication de l'agent infectieux dont la guérison se fait soit de façon spontanée ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Canaud *et al.*, 2003; Charles *et al.*, 2010).

#### I.1.3.2. Inflammation chronique

Une réaction inflammatoire chronique se traduit par une agression répétée ou prolongée (plusieurs mois ou années) qui s'avère délétère pour l'organisme du fait de son incapacité à éliminer l'agent agresseur (Canaud *et al.*, 2003). Les signes de début sont identiques à ceux d'une inflammation aiguë, mais les destructions tissulaires sont plus graves avec des conséquences fonctionnelles profondes. Ce type d'inflammation laisse des séquelles anatomiques et fonctionnelles (Weill et Batteux, 2003).

### I.1.4. Cellules et médiateurs de l'inflammation

Le phénomène inflammatoire met en jeu différents acteurs cellulaires et protéiques dont l'action synchrone assure la production des médiateurs de l'inflammation.

#### I.1.4.1. les cellules impliquées dans la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire fait intervenir plusieurs types cellulaires qui ont pour origine un précurseur commun, ces derniers peuvent être classés en deux grandes familles (Prine, 1996) :

- ✓ Ceux qui proviennent d'une cellule souche myéloïde, donnant naissance aux polynucléaires, aux monocytes/macrophages, cellules dendritiques, cellules érythrocytaires et plaquettes ;
- ✓ Ceux qui proviennent d'une cellule souche lymphoïde donnant naissance aux lymphocytes T, B et NK (Natural Killer).

### I.1.4.2. Les médiateurs de l'inflammation

Les changements locaux qui surviennent au niveau du site inflammatoire sont le résultat de la formation et/ou la libération séquentielle de médiateurs pro et anti-inflammatoires de nature divers, amine (histamine et sérotonine), médiateurs lipidiques (prostaglandines et leucotriènes), et des cytokines de nature peptidique, protéique ou glycoprotéique (**Botting et Botting, 2000**).

**Tableau I : Rôle des principaux médiateurs de l'inflammation (Rankine, 2004; Male et al., 2007).**

Classe	Médiateurs	Rôles
<b>Amines vaso-actives</b>	-Histamine  -Sérotonine	- Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire. - Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires.
<b>Médiateurs lipidiques</b>	-prostaglandine  -leucotriène	- Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, responsable de la sensation de douleur - Augmente la perméabilité vasculaire et le flux sanguin local, induit la libération des enzymes lysosomales et la production des ERO et attire et active les cellules inflammatoires.
<b>Radicaux libres</b>	-espèces réactives de l'oxygène (ERO)	- Une action nécrosante et peuvent endommager les cellules endothéliales, inactivent les anti protéases et activent la phospholipase A <sub>2</sub> .
<b>Cytokines</b>	- interleukines, chimiokines - Les interférons (INF $\alpha$ , $\beta$ ...) -Les facteurs de nécrose (TNF $\alpha$ )	- Augmente le recrutement et l'activité phagocytaire des PNN, Contrôle les interactions entre les leucocytes et activent différentes cellules immunitaires.

### I.1.5. Les anti-inflammatoires

#### I.1.5.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Le traitement de l'inflammation fait appel à plusieurs thérapies parmi lesquelles l'administration des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (**Russo-Marie et al., 1998**). Ces composés ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur et la fièvre du fait qu'ils regroupent un ensemble de molécules présentant des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques.

Leur efficacité est liée à leur mécanisme d'action principale qui est l'inhibition des cyclo-oxygénases, enzymes responsables de la biosynthèse des prostaglandines et du thromboxane (**Bidaut-Russell et Gabriel, 2001; Orliaguet et al., 2013**).

**Tableau II** : Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (**Wallace et Staats, 2004**).

Classe structurale	Salicylates	Dérives D'acide propénoïque	Dérives d'acide acétique	Indoles
Nom scientifique	Acide acétylsalicylique	Ibuprofène	Diclofenac	Indométacine
Nom commercial	<b>Aspirine®</b>	<b>Ibuprofène®</b>	<b>Voltarene®</b>	<b>Indocine®</b>

- **Mécanisme d'action des AINS**

- Inhibition de la synthèse des prostaglandines**

En effet la réduction de la production des prostaglandines limite l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le chimiotactisme des neutrophiles lors de la réponse inflammatoire (**Kindt et al., 2008**).

- Inhibition de la production des superoxydes**

Les AINS limitent la production des superoxydes en inhibant la synthèse des prostaglandines. Ces radicaux libres sont produits par les macrophages et polynucléaires au cours de la phagocytose et sont responsables des lésions tissulaires (**Yoshihiko, 1976**).

- Stabilisation des membranes lysosomales**

La dégradation des membranes cellulaires et lysosomales dans un foyer inflammatoire aboutit à la libération de nombreuses enzymes destructrices. Certains anti-inflammatoires non stéroïdiens stabilisent la membrane lysosomale par le biais des transferts calciques

membranaires et/ou des stocks d'AMPc et préviennent ainsi la libération d'enzymes lytiques (Lekeux, 1991).

Cependant l'usage des AINS est associé à de nombreux effets indésirables qui sont dus essentiellement à la non spécificité envers les deux principales isoformes de la cyclo-oxygénase : la COX1 et la COX2.

La COX1 est une isoforme constitutive ayant un rôle physiologique majeur dans la plupart des tissus humains (Lipsky *et al.*, 2000). Tandis que la COX2 est une isoforme inductible synthétisée suite à sa stimulation par le TNF $\alpha$  et l'interleukine 1, elle est donc associée à l'apparition de phénomènes inflammatoires et qui possède un rôle physiopathologique (Ouédraogo *et al.*, 2012).

### I.1.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les AIS ou encore glucocorticoïdes sont des dérivés synthétiques des hormones naturelles le cortisol et la cortisone, constituant une classe de médicaments largement répandus dans le traitement et la suppression de l'inflammation dans les maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme et l'arthrite rhumatoïde (Barnes, 1998).

Les glucocorticoïdes ont, comme les AINS une action inhibitrice sur synthèse des Prostaglandines. Cette action s'exerce principalement sur la phospholipase A2, en amont du métabolisme de l'acide arachidonique par la COX2 ce qui conduit à la suppression de l'inflammation (Figure 2).

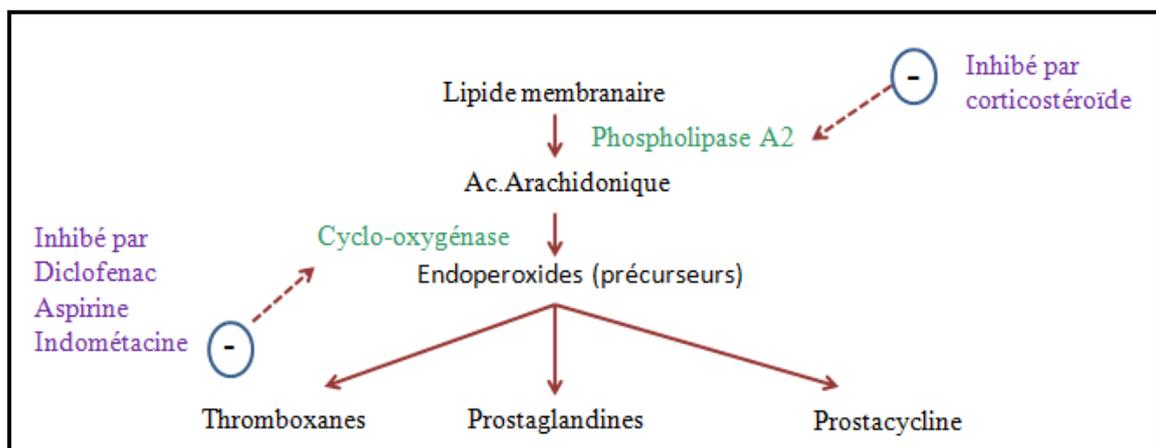


Figure 2 : La biosynthèse des prostaglandines et leurs inhibitions (Rao et Knaus, 2008).

Cependant ils ont une action plus large que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, action à la fois cytoplasmique et génomique par leurs liaisons aux récepteurs des glucocorticoïdes dans le cytoplasme, induisant ainsi leurs dimérisations et leurs translocations vers le noyau (Barnes, 1998; Orliaguet *et al.*, 2013), où ils jouent un rôle d'un facteur de transcription en exerçant leur effet anti-inflammatoire par deux voies majeures :

- le complexe GR-GC interagit avec le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B favorisant la régulation négative de l'expression des gènes pro inflammatoire, y compris IL-1  $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$  ;
- le complexe GR-GC se lie aux éléments de réponse des glucocorticoïdes (GRE) dans le noyau stimulant la régulation de l'expression de gènes anti-inflammatoires, y compris la lipocortine-1,  $\beta$ 2-Adrénorécepteur et annexine-1 (Ge *et al.*, 2014).

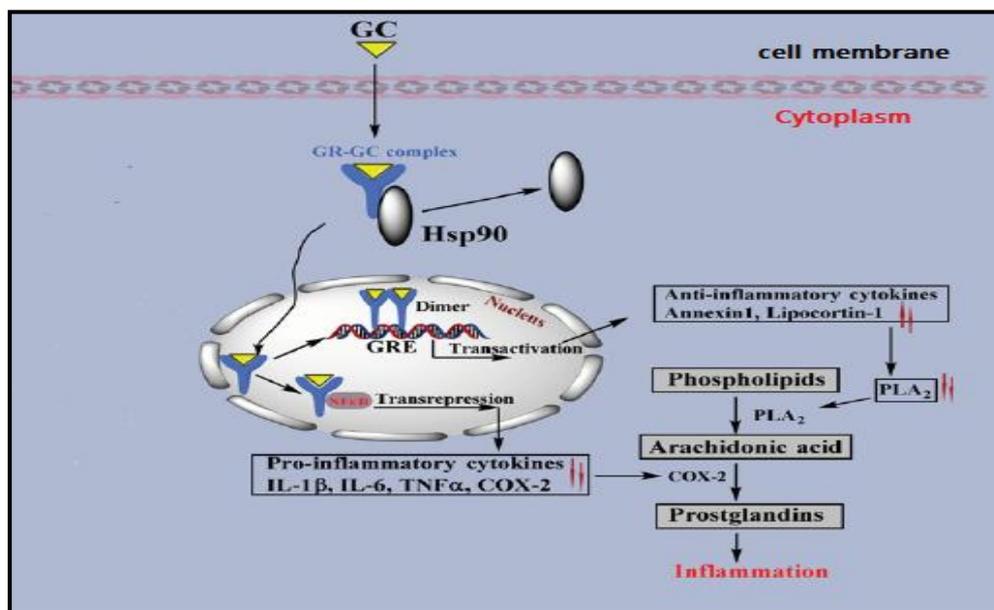


Figure 3 : Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (Ge *et al.*, 2014).

### I.1.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Aujourd'hui les plantes médicinales jouent un rôle important dans les traditions thérapeutiques, cela revient à leur composition phytochimique très vaste qui constitue une source inépuisable de nouvelles molécules utilisables directement comme principe actif pour le traitement de nombreuses pathologies.

Les produits de métabolisme secondaire sont en très grand nombre y compris les composés phénoliques, Terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes qui sont des exemples

de métabolite secondaire qui ont de nombreuses applications pharmaceutiques (Hartmann, 2007).

Dans ce contexte, plusieurs exemples de ces composés purs peuvent être cités :

- **Silymarine** : est un principe actif extrait à partir d'une plante **Chardon-Marie** cette molécule est en fait constituée de l'association de trois flavonoïdes de structure isomérique silychristine, silydianine et la silybine, cette dernière étant de loin la plus active (Šeršeň *et al.*, 2006).

La silymarine est utilisée dans le traitement d'un grand nombre de désordres hépatiques grâce à ses propriétés hépato protective, elle est considérée également comme un puissant antioxydant grâce à sa molécule active, la silybine, qui protège les globules rouges et stabilise leurs membranes en neutralisant efficacement différents radicaux libres et en inhibant la peroxydation lipidique. Récemment, l'effet anti-inflammatoire de la silymarine attire une attention croissante du fait de sa capacité à freiner la formation des prostaglandines pro inflammatoires PGE-2 et l'IL1 mais le mécanisme de cet effet n'est pas entièrement compris (Freeman, 2003; Mégarbane *et al.*, 2007).

- **Quercétine** : Son effet anti-inflammatoire est exercé en inhibant la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase, les principaux médiateurs de l'inflammation (Middleton et Drzewiecki, 1984).

## I.1.6. Implication des lysosomes dans l'inflammation

### I.1.6.1. Définition de lysosomes

Les lysosomes sont des organelles cytoplasmiques présentes dans toutes les cellules de l'organisme des mammifères à l'exception des hématies (Hochschild, 1971), caractérisés par une richesse en enzymes hydrolytiques (protéases, nucléase, galactosidases, lipases...) dont le fonctionnement est optimal à pH acide (3 à 5). Ils sont entourés par une membrane phospholipidique qui protège le contenu cellulaire de l'action lytique des enzymes (Matsuyama *et al.*, 2000). Cette membrane porte également à sa surface une pompe à protons (ATP dépendant) qui permet le maintien d'un pH acide dans cet organite (Maire, 2012) (Figure 4).

Le lysosome est considéré comme un véritable appareil digestif « organite suicide » intracellulaire du fait de sa capacité à dégrader toutes les composantes cellulaires (protéine,

sucre et lipides) ainsi que les principaux constituants des tissus (Coujard et Poirier, 1980) par des mécanismes d'hétérophagie et d'autophagie (Ciechanover, 2005)

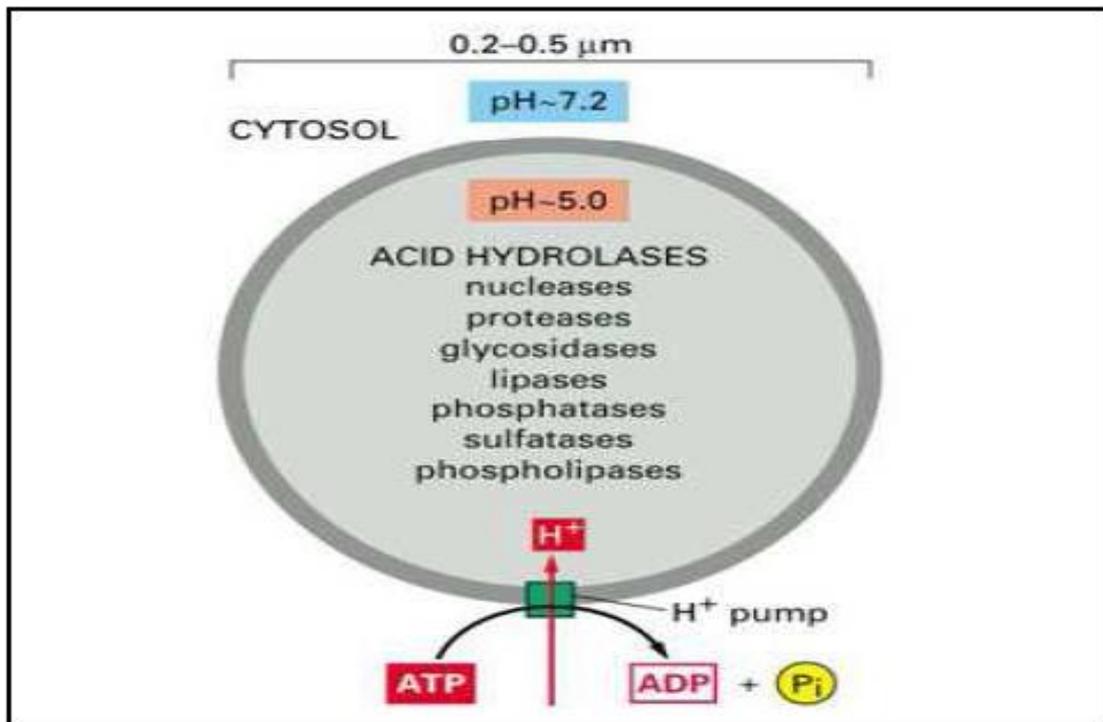


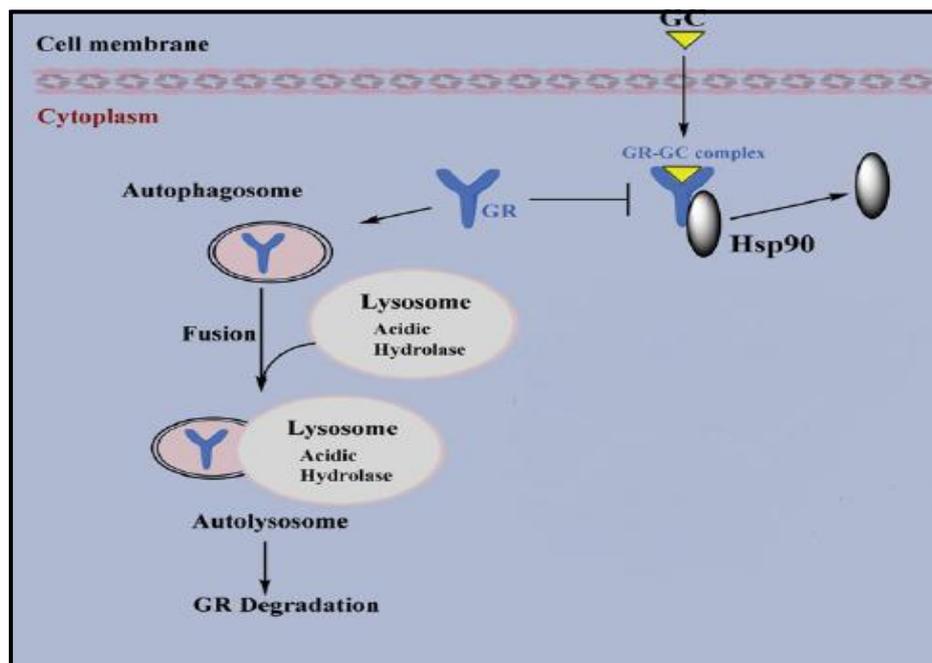
Figure 4 : Structure du lysosome (Albert, 2003).

#### I.1.6.2. Rôle des enzymes libérés par les lysosomes

Au cours de la phagocytose les microparticules sont internalisées par les phagocytes professionnels qui sont les macrophages, ce phénomène biologique pourrait induire une rupture des lysosomes du fait que les endosomes issus de la phagocytose fusionne avec des lysosomes acides (Hornung *et al.*, 2008). La diminution du pH lysosomal provoque alors une déstabilisation et une perméabilisation du lysosome, dont la rupture diminue le pH intracellulaire. Le contenu lysosomal protéolytique est alors libéré dans le cytosol. Cette rupture lysosomale provoque également un efflux de K<sup>+</sup>, qui provoque à son tour l'augmentation de sodium intracellulaire (Na<sup>+</sup>), ce qui augmente l'osmolarité et induit un influx d'eau, qui fait gonfler la cellule et qui est dû aux aquaporines. Ainsi la concentration en K<sup>+</sup> intracellulaire diminue dramatiquement (Schorn *et al.*, 2011).

### I.1.6.3. Dégradation des récepteurs de glucocorticoïde par les lysosomes

Il a été démontré que les enzymes lysosomales libérées au cours de l'inflammation exercent une action sur les récepteurs des glucocorticoïdes de deux manières : en se fondant avec des autos-phagosome, l'interaction de ces derniers avec le lysosome abouti à la dégradation de ce récepteur (GR) ou bien par l'inactivation du récepteur via un changement dans le complexe (GR)-Hsp90 en une forme plus petite empêchant ainsi l'interaction du (GR) avec son ligand (GC) (Ge *et al.*, 2014) (Figure5).



**Figure 5** : Dégradation des récepteurs de glucocorticoïdes par le lysosome (Ge *et al.*, 2014).

### I.1.6.4. La déstabilisation lysosomale médiée par les ERO

Les ERO interviennent à plusieurs niveaux au cours des processus inflammatoires (Borel *et al.*, 1988), considérées comme des molécules clés qui jouent un rôle important dans la progression de désordres inflammatoires (Mittal *et al.*, 2014). Les ERO ainsi générés déstabilisent la membrane lysosomale par peroxydation des lipides membranaires et une dégradation des protéines membranaires (Baird *et al.*, 2006).

### I.1.7. Erythrocyte comme modèle d'études de l'activité anti-inflammatoire des substances

Les lysosomes jouent un rôle primordial dans le processus inflammatoire en produisant une variété de troubles, de désordres et de l'amplification de l'inflammation aiguë et chronique. L'absence d'organites cellulaires au niveau des érythrocytes ainsi que la

similitude de ses constituants membranaires avec ceux des lysosomes font de ces cellules un bon modèle d'étude de l'activité anti-inflammatoire (Wajcman *et al.*, 1992).

L'érythrocyte, appelé aussi hématie ou encore globule rouge, est une cellule mature anucléée de la lignée érythrocytaire, formée dans la moelle osseuse lors du processus de l'érythropoïèse à partir des érythroblastes. Il a la forme d'une lentille biconcave d'un diamètre qui varie de 7 à 8µm. Il se présente comme un sac contenant des enzymes, de l'hémoglobine qui renferme un pigment respiratoire dont la fonction principale est de véhiculer l'oxygène dans l'organisme (Sultan *et al.*, 1987; Lévy *et al.*, 2001; Smaili, 2008).

#### **I.1.7.1. Constituants de l'érythrocyte**

La structure du globule rouge se décompose en trois éléments principaux : la membrane, les enzymes, et l'hémoglobine.

- **La membrane érythrocytaire**

La membrane érythrocytaire, à l'image de celle des autres cellules de l'organisme (Wajcman *et al.*, 1992) est constituée d'une trame lipidique en double feuillet où s'intercale des protéines.

Du côté interne, le réseau protéique constitue le cytosquelette qui confère la forme discocytaire au globule rouge, assurant ainsi sa grande déformabilité, du côté externe, se situent les récepteurs et les motifs antigéniques du globule rouge et des groupes sanguins (ABO, Rhésus, etc.....) (Sébahoun, 2015; Singer et Nicolson, 1972).

- **Les enzymes érythrocytaires**

Cet équipement enzymatique assure un certain nombre de fonctions parmi elles la production d'énergie, le maintien de la forme biconcave des hématies et la lutte contre les agressions médiées par les agents oxydants (Wajcman *et al.*, 1992).

- **L'hémoglobine**

L'hémoglobine est une des protéines les mieux connues, stable et facile à obtenir. Elle constitue 33% du poids d'un globule rouge (Smaili, 2008). Formée de l'union d'un ensemble de quatre chaînes polypeptidique (la globine) et de quatre molécules d'une ferroporphyrine (l'hème) (Janssens, 2009).



*CHAPITRE II*  
*MATÉRIEL ET MÉTHODES*

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel et équipement

Centrifugeuse (SIGMA), une plaque agitatrice (VELP Scientifica), bain-marie (RAYPA), vortex (VELP), un spectrophotomètre VIS-7220G, balance analytique (RADWAG), balance de précision (RADWA), un microscope optique, tubes à essai, tubes à hémolyse, micropipette, Eppendorf, cuve de spectrophotomètre, microplaque (96 puits), lecteur de microplaques.

### II.1.2. Réactifs chimiques

Les réactifs chimiques utilisés dans la présente étude : eau physiologique (0,9%, pH=7,41), solution de NaCl (0,2%), eau distillée, éthanol, méthanol, chlorure du sodium, acide acétyle salicylique, Silymarine, caféine, catéchine, quercétine, acide caféique de marque sigma, DPPH, ABTS, Persulfate de potassium.

### II.1.3. Matériel biologique

- **Sang humain** : le sang a été récupéré au niveau du Laboratoire D<sup>r</sup> : LALLAOUI, prélevé par ponction intraveineuse à partir des patients sains (non anémique et qui n'ont pas reçu d'anti-inflammatoires). Le sang a été recueilli dans des tubes stériles contenant de l'héparine de Lithium comme anticoagulant.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Évaluation de l'activité antioxydante

Pour étudier l'activité anti radicalaire des différentes molécules pures végétales nous avons opté pour deux méthodes utilisant le piégeage des radicaux libres différents, comme radical DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle) et le radical ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).

#### II.2.1.1. Test de l'activité anti radicalaire en utilisant le DPPH

##### A. Principe

Le composé chimique (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. L'activité scavenging des molécules contre le radical synthétique stable a été déterminée spectrophotométriquement en utilisant la méthode de **Masuda et al. (1999)**.

Cette méthode spectrophotométrique est basée sur la réduction de DPPH de couleur violette en un composé jaune (diphénylpicryl-hydrazine) en présence du capteur de radicaux libres ceci permet de suivre la cinétique de la décoloration à 517 nm. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu contenant des composés donneurs des protons (Sánchez-Moreno, 2002) (Figure 6).

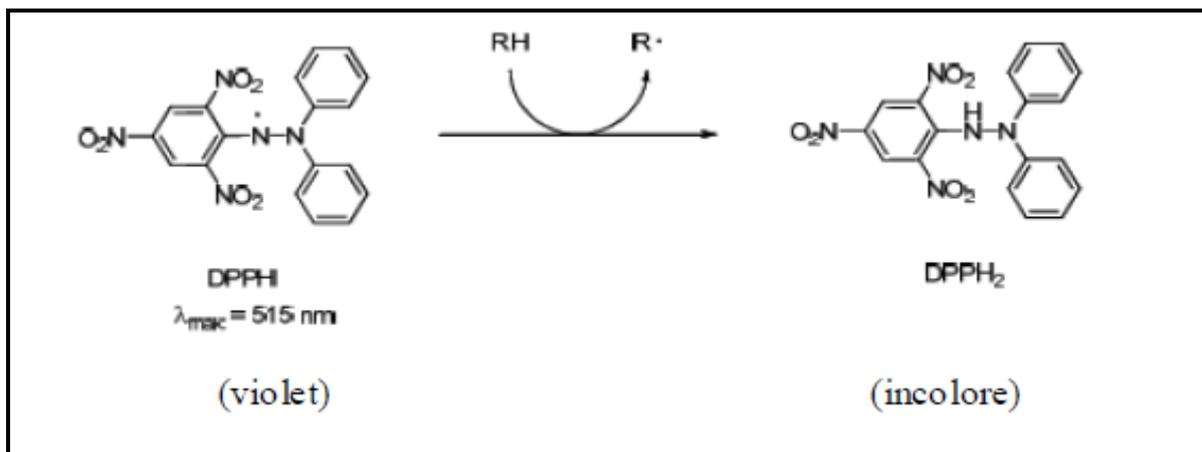


Figure 6 : Structure du DPPH et sa réduction par un antioxydant.

### B. Mise en œuvre pratique

Pratiquement une solution de DPPH (100  $\mu\text{M}$ ) a été préparée par solubilisation de 0,2 mg de DPPH dans 5ml de méthanol. Un volume de 180  $\mu\text{l}$  de cette solution a été déposé sur une microplaque à laquelle il a été additionné 20  $\mu\text{l}$  de la solution test. Le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration a été comparée par rapport à un contrôle qui contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester.

La mesure de l'absorbance est faite à 517 nm contre un blanc de méthanol en utilisant un lecteur microplaques.

### II.2.1.2. Test de l'activité anti radicalaire par la méthode d'ABTS

#### A. Principe

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS, au cours de ce test le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cation ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) de couleur sombre (bleu-vert) en solution. Quand l' $\text{ABTS}^{\bullet+}$  est mis en présence d'un antioxydant, on constate un retour à l'état initial réduit qui s'accompagne d'une diminution de l'intensité de la couleur et une diminution de l'absorbance à 734nm (Figure 7) (Re et al., 1999).

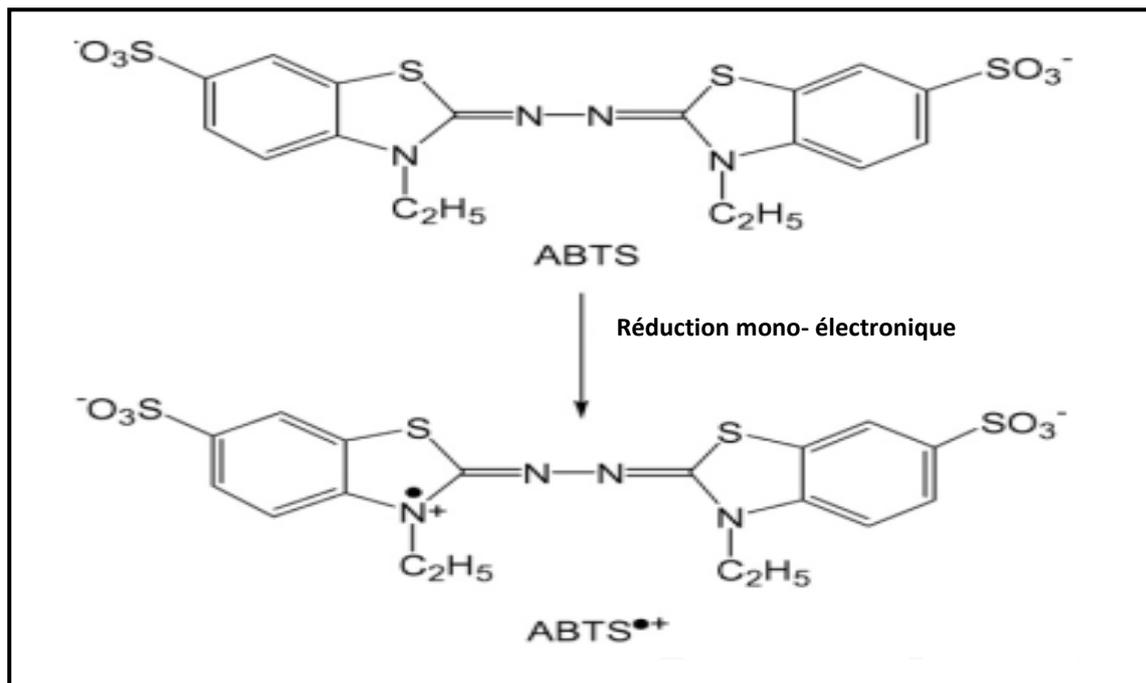


Figure 7 : Formes oxydée et réduite de l'ABTS.

### B. Mise en œuvre pratique

#### ➤ Préparation de la solution d'ABTS<sup>+</sup>

Le radical cation ABTS<sup>+</sup> est généré en mélangeant 6 mg de persulfate de potassium (2,45 mM) solubilisé dans de l'eau distillée avec 36 mg d'ABTS (7 mM), le mélange obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à une température ambiante durant 16 h avant utilisation. La solution préparée a été diluée avec l'éthanol d'une manière à avoir une solution ayant une absorbance de  $0,7 \pm 0,05$  à 734 nm.

#### ➤ Mesure de l'activité

Une gamme de concentrations (12,5 à 600 ug/ml) des molécules à tester a été préparée dans le méthanol. Un volume de 20 ul de cette solution est mélangé avec 180 ul d'ABTS. Après homogénéisation, le mélange a été incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 6 min d'incubation, l'absorbance est lue à 734 nm contre un « blanc » qui contient 180 ul d'ABTS et 20 ul du méthanol.

### II.2.1.3. Expression des résultats

L'activité scavenging du radical DPPH et d'ABTS est exprimée en pourcentage d'inhibition de ces derniers selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \left( \frac{\text{ABS contrôle} - \text{ABS Test}}{\text{ABS contrôle}} \right) * 100$$

## II.2.2. Étude de la cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges

### A. Principe

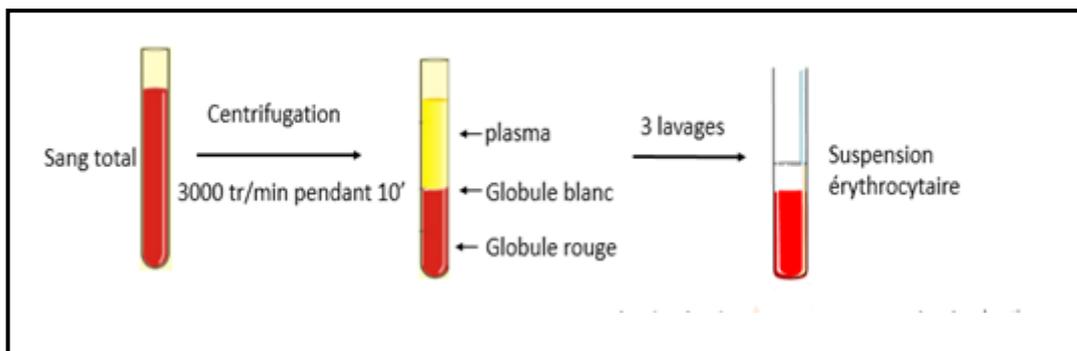
Les cellules sanguines humaines plus précisément les globules rouges ont été choisis comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* cela est dû essentiellement à leur facilité d'isolement et à leurs simplicités. Ils sont un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires via la membrane érythrocytaire (Wajcman *et al.*, 1992).

### B. Mise en œuvre pratique

#### ➤ Préparation de la suspension érythrocytaire

Le sang recueilli dans des tubes héparinés a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min, après centrifugation le surnageant a été éliminé soigneusement à l'aide d'une micropipette et le culot est ensuite lavé trois fois avec une solution saline isotonique dont le volume est équivalent à celui du surnageant. La suspension est homogénéisée par retournement lors de chaque lavage et le surnageant est éliminée par aspiration.

À l'issue de la dernière centrifugation le culot obtenu est reconstitué en suspension de 10% (V/V) dans la même solution de lavage (Sadique *et al.*, 1989; Saket *et al.*, 2010) (Figure 8).



**Figure 8** : Principales étapes d'isolement des globules rouges à partir du sang humain.

### ➤ Test de cytotoxicité

Dans des tubes à hémolyse 0,5 ml de la suspension érythrocytaire a été mis en mélange avec 5ml d'eau physiologique contenant les composés testés à différentes concentrations (500 et 1000 ug/ml).

Un tube (témoin négatif) a été préparé dans la même démarche expérimentale contenant 0,5 ml de la suspension érythrocytaire et 5 ml d'eau physiologique.

Pour le contrôle positif, l'hémolyse est obtenue par la mise en suspension des globules rouges dans une solution hypotonique NaCl 0,2%.

Tous les tubes ont été incubés à 37°C durant 30 min puis centrifugés à 3000 tr/min pendant 10min. Les observations macroscopiques ainsi que des frottis sanguin ont été réalisés

## II.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire des molécules testées est évaluée *in vitro* via la méthode basée sur la déstabilisation membranaire des globules rouges induite par un choc hypotonique (Umukoro et Ashorob, 2006).

### II.2.3.1. Hémolyse induite par choc hypotonique

#### A. Principe

Le principe de ce test repose sur l'incubation des globules rouges dans un milieu hypotonique (NaCl à 0,2%) induisant ainsi une hémolyse. Cette hémolyse est le résultat de l'absence de contre pression dans le cytoplasme ce qui laisse la solution hypotonique diffuser vers l'intérieur de la cellule (hypertonique) à travers la membrane. L'entrée massive de la solution dans le globule rouge entraîne son gonflement, puis son éclatement.

**Mise en œuvre pratique****➤ Préparation des solutions et des produits à tester**

Les molécules à tester silymarine, caféine, catéchine et quercétine à des concentrations qui varient de 350 à 500 ug/ml ont été dissoutes dans un volume de 5ml (v.v) 50 % méthanol 50 % solution hypotonique. Les tubes ont été homogénéisés au vortex. En ce qui concerne les contrôles une paire de contrôle négatif / positif est préparée en parallèle dont le premier contient 5 ml de l'eau physiologique et le deuxième contient une solution de NaCl à 0,2% ainsi qu'un standard qui est l'acide acétyle salicylique.

À l'issue de ces préparations un volume de la suspension érythrocytaire de 0,5 ml a été ajouté à chaque tube. Après une incubation de 30 min à 37°C les tubes ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10min. La mesure de l'absorbance des surnageants a été effectuée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

**II.2.3.2. Expression des résultats****➤ Calcul des pourcentages d'hémolyse**

Le taux d'hémolyse au niveau de chaque échantillon est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, selon la formule suivante :

$$\% \text{ de l'hémolyse} = \left( \frac{ABS_{\text{test}} - ABS_{\text{contrôle négatif}}}{ABS_{\text{contrôle positif}}} \right) * 100$$

**➤ Calcul des pourcentages d'inhibition de l'hémolyse**

Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés à partir de la conversion des absorbances des échantillons par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = 1 - \left( \frac{OD_2 - OD_1}{OD_3 - OD_1} \right) * 100$$

**D'où :**

**OD<sub>1</sub>** : Absorbance à 540 nm du contrôle négatif;

**OD<sub>2</sub>** : Absorbance à 540 nm des échantillons testés;

**OD<sub>3</sub>** : Absorbance à 540 nm du contrôle positif.

**II.3. Analyse statistique :**

Tous les résultats expérimentaux ont été exprimés comme moyenne  $\pm$  écart type ou SEM. Les différences entre les groupes ont été déterminées en utilisant le logiciel Graph Pad et l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test Student Tukey method pour une analyse post hoc. Les différences ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ .

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel et équipement

Centrifugeuse (SIGMA), une plaque agitatrice (VELP Scientifica), bain-marie (RAYPA), vortex (VELP), un spectrophotomètre VIS-7220G, balance analytique (RADWAG), balance de précision (RADWA), un microscope optique, tubes à essai, tubes à hémolyse, micropipette, Eppendorf, cuve de spectrophotomètre, microplaque (96 puits), lecteur de microplaques.

### II.1.2. Réactifs chimiques

Les réactifs chimiques utilisés dans la présente étude : eau physiologique (0,9%, pH=7,41), solution de NaCl (0,2%), eau distillée, éthanol, méthanol, chlorure du sodium, acide acétyle salicylique, Silymarine, caféine, catéchine, quercétine, acide caféique de marque sigma, DPPH, ABTS, Persulfate de potassium.

### II.1.3. Matériel biologique

- **Sang humain** : le sang a été récupéré au niveau du Laboratoire D<sup>r</sup> : LALLAOUI, prélevé par ponction intraveineuse à partir des patients sains (non anémique et qui n'ont pas reçu d'anti-inflammatoires). Le sang a été recueilli dans des tubes stériles contenant de l'héparine de Lithium comme anticoagulant.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Évaluation de l'activité antioxydante

Pour étudier l'activité anti radicalaire des différentes molécules pures végétales nous avons opté pour deux méthodes utilisant le piégeage des radicaux libres différents, comme radical DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle) et le radical ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).

#### II.2.1.1. Test de l'activité anti radicalaire en utilisant le DPPH

##### A. Principe

Le composé chimique (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. L'activité scavenging des molécules contre le radical synthétique stable a été déterminée spectrophotométriquement en utilisant la méthode de **Masuda *et al.* (1999)**.

Cette méthode spectrophotométrique est basée sur la réduction de DPPH de couleur violette en un composé jaune (diphénylpicryl-hydrazine) en présence du capteur de radicaux libres ceci permet de suivre la cinétique de la décoloration à 517 nm. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu contenant des composés donneurs des protons (Sánchez-Moreno, 2002) (Figure 6).

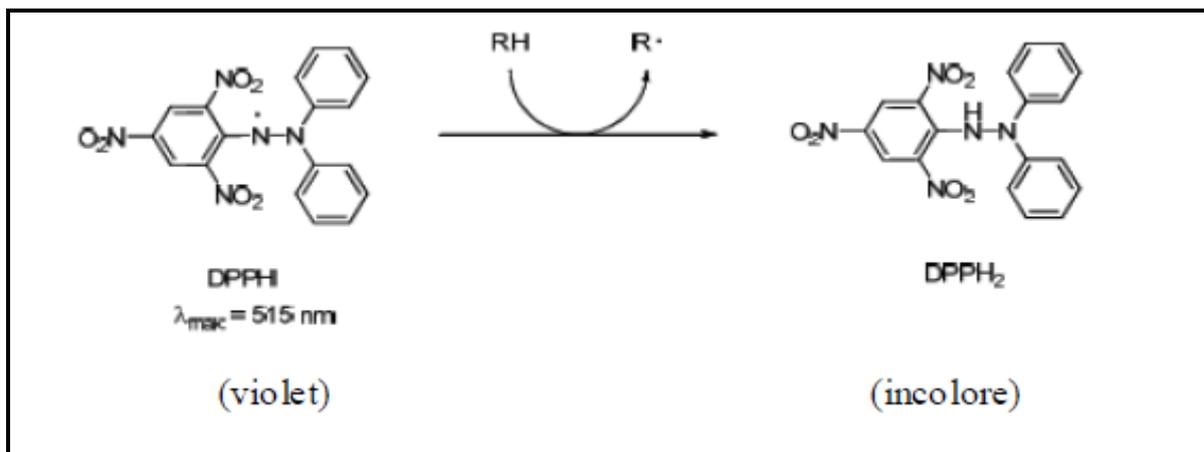


Figure 6 : Structure du DPPH et sa réduction par un antioxydant.

### B. Mise en œuvre pratique

Pratiquement une solution de DPPH (100  $\mu\text{M}$ ) a été préparée par solubilisation de 0,2 mg de DPPH dans 5ml de méthanol. Un volume de 180  $\mu\text{l}$  de cette solution a été déposé sur une microplaque à laquelle il a été additionné 20  $\mu\text{l}$  de la solution test. Le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration a été comparée par rapport à un contrôle qui contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester.

La mesure de l'absorbance est faite à 517 nm contre un blanc de méthanol en utilisant un lecteur microplaques.

### II.2.1.2. Test de l'activité anti radicalaire par la méthode d'ABTS

#### A. Principe

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS, au cours de ce test le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cation ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) de couleur sombre (bleu-vert) en solution. Quand l' $\text{ABTS}^{\bullet+}$  est mis en présence d'un antioxydant, on constate un retour à l'état initial réduit qui s'accompagne d'une diminution de l'intensité de la couleur et une diminution de l'absorbance à 734nm (Figure 7) (Re *et al.*, 1999).

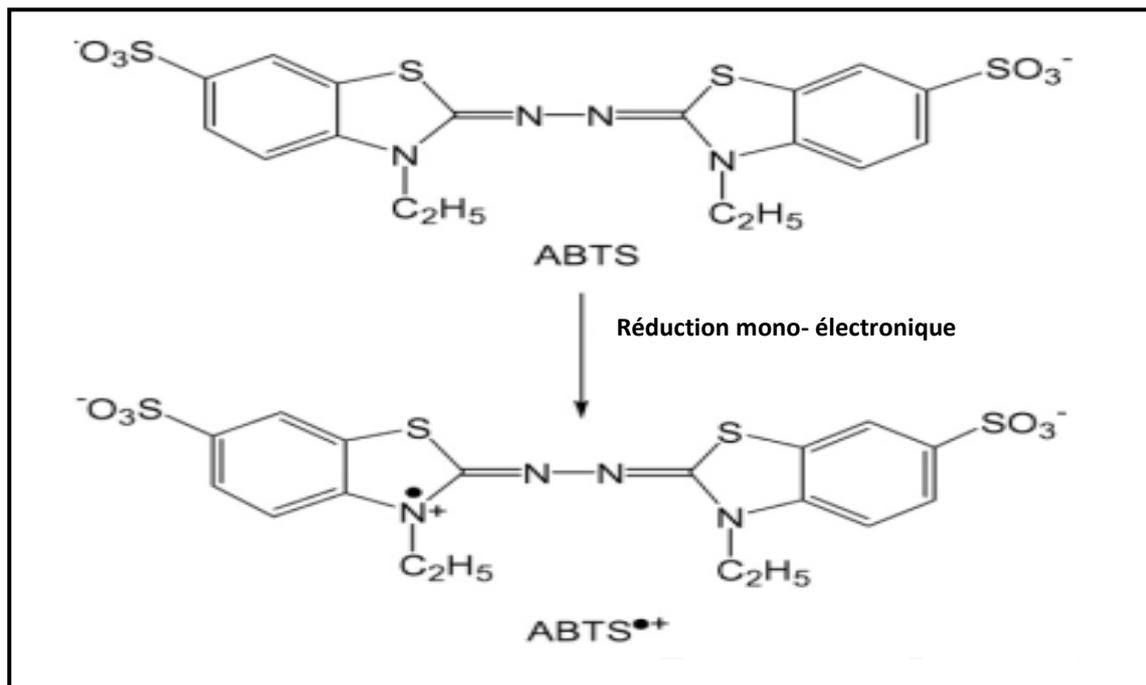


Figure 7 : Formes oxydée et réduite de l'ABTS.

### B. Mise en œuvre pratique

#### ➤ Préparation de la solution d'ABTS<sup>+</sup>

Le radical cation ABTS<sup>+</sup> est généré en mélangeant 6 mg de persulfate de potassium (2,45 mM) solubilisé dans de l'eau distillée avec 36 mg d'ABTS (7 mM), le mélange obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à une température ambiante durant 16 h avant utilisation. La solution préparée a été diluée avec l'éthanol d'une manière à avoir une solution ayant une absorbance de  $0,7 \pm 0,05$  à 734 nm.

#### ➤ Mesure de l'activité

Une gamme de concentrations (12,5 à 600 µg/ml) des molécules à tester a été préparée dans le méthanol. Un volume de 20 µl de cette solution est mélangé avec 180 µl d'ABTS. Après homogénéisation, le mélange a été incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 6 min d'incubation, l'absorbance est lue à 734 nm contre un « blanc » qui contient 180 µl d'ABTS et 20 µl du méthanol.

### II.2.1.3. Expression des résultats

L'activité scavenging du radical DPPH et d'ABTS est exprimée en pourcentage d'inhibition de ces derniers selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \left( \frac{\text{ABS contrôle} - \text{ABS Test}}{\text{ABS contrôle}} \right) * 100$$

## II.2.2. Étude de la cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges

### A. Principe

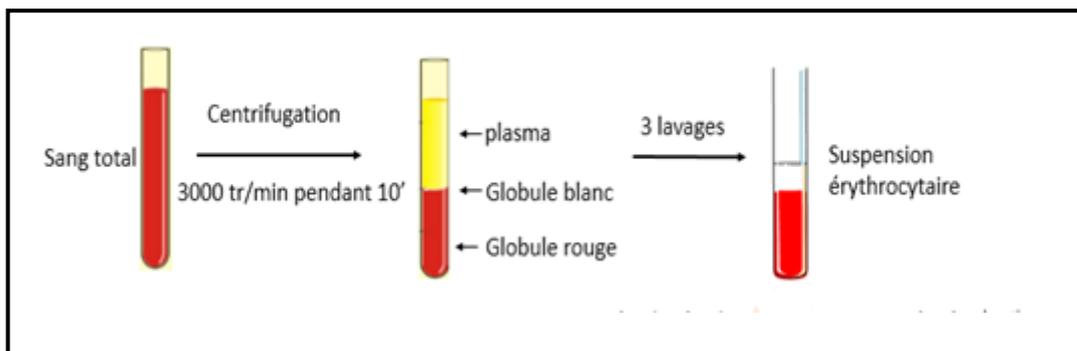
Les cellules sanguines humaines plus précisément les globules rouges ont été choisis comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* cela est dû essentiellement à leur facilité d'isolement et à leurs simplicités. Ils sont un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires via la membrane érythrocytaire (Wajcman *et al.*, 1992).

### B. Mise en œuvre pratique

#### ➤ Préparation de la suspension érythrocytaire

Le sang recueilli dans des tubes héparinés a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min, après centrifugation le surnageant a été éliminé soigneusement à l'aide d'une micropipette et le culot est ensuite lavé trois fois avec une solution saline isotonique dont le volume est équivalent à celui du surnageant. La suspension est homogénéisée par retournement lors de chaque lavage et le surnageant est éliminée par aspiration.

À l'issue de la dernière centrifugation le culot obtenu est reconstitué en suspension de 10% (V/V) dans la même solution de lavage (Sadique *et al.*, 1989; Saket *et al.*, 2010) (Figure 8).



**Figure 8** : Principales étapes d'isolement des globules rouges à partir du sang humain.

### ➤ Test de cytotoxicité

Dans des tubes à hémolyse 0,5 ml de la suspension érythrocytaire a été mis en mélange avec 5ml d'eau physiologique contenant les composés testés à différentes concentrations (500 et 1000 ug/ml).

Un tube (témoin négatif) a été préparé dans la même démarche expérimentale contenant 0,5 ml de la suspension érythrocytaire et 5 ml d'eau physiologique.

Pour le contrôle positif, l'hémolyse est obtenue par la mise en suspension des globules rouges dans une solution hypotonique NaCl 0,2%.

Tous les tubes ont été incubés à 37°C durant 30 min puis centrifugés à 3000 tr/min pendant 10min. Les observations macroscopiques ainsi que des frottis sanguin ont été réalisés

## II.2.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire des molécules testées est évaluée *in vitro* via la méthode basée sur la déstabilisation membranaire des globules rouges induite par un choc hypotonique (Umukoro et Ashorob, 2006).

### II.2.3.1. Hémolyse induite par choc hypotonique

#### A. Principe

Le principe de ce test repose sur l'incubation des globules rouges dans un milieu hypotonique (NaCl à 0,2%) induisant ainsi une hémolyse. Cette hémolyse est le résultat de l'absence de contre pression dans le cytoplasme ce qui laisse la solution hypotonique diffuser vers l'intérieur de la cellule (hypertonique) à travers la membrane. L'entrée massive de la solution dans le globule rouge entraîne son gonflement, puis son éclatement.

**Mise en œuvre pratique****➤ Préparation des solutions et des produits à tester**

Les molécules à tester silymarine, caféine, catéchine et quercétine à des concentrations qui varient de 350 à 500 ug/ml ont été dissoutes dans un volume de 5ml (v.v) 50 % méthanol 50 % solution hypotonique. Les tubes ont été homogénéisés au vortex. En ce qui concerne les contrôles une paire de contrôle négatif / positif est préparée en parallèle dont le premier contient 5 ml de l'eau physiologique et le deuxième contient une solution de NaCl à 0,2% ainsi qu'un standard qui est l'acide acétyle salicylique.

À l'issue de ces préparations un volume de la suspension érythrocytaire de 0,5 ml a été ajouté à chaque tube. Après une incubation de 30 min à 37°C les tubes ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10min. La mesure de l'absorbance des surnageants a été effectuée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

**II.2.3.2. Expression des résultats****➤ Calcul des pourcentages d'hémolyse**

Le taux d'hémolyse au niveau de chaque échantillon est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, selon la formule suivante :

$$\% \text{ de l'hémolyse} = \left( \frac{ABS_{\text{test}} - ABS_{\text{contrôle négatif}}}{ABS_{\text{contrôle positif}}} \right) * 100$$

**➤ Calcul des pourcentages d'inhibition de l'hémolyse**

Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés à partir de la conversion des absorbances des échantillons par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = 1 - \left( \frac{OD_2 - OD_1}{OD_3 - OD_1} \right) * 100$$

**D'où :**

**OD<sub>1</sub>** : Absorbance à 540 nm du contrôle négatif;

**OD<sub>2</sub>** : Absorbance à 540 nm des échantillons testés;

**OD<sub>3</sub>** : Absorbance à 540 nm du contrôle positif.

**II.3. Analyse statistique :**

Tous les résultats expérimentaux ont été exprimés comme moyenne  $\pm$  écart type ou SEM. Les différences entre les groupes ont été déterminées en utilisant le logiciel Graph Pad et l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test Student Tukey method pour une analyse post hoc. Les différences ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ .

*CHAPITRE III*  
*RÉSULTATS ET DISCUSSIONS*

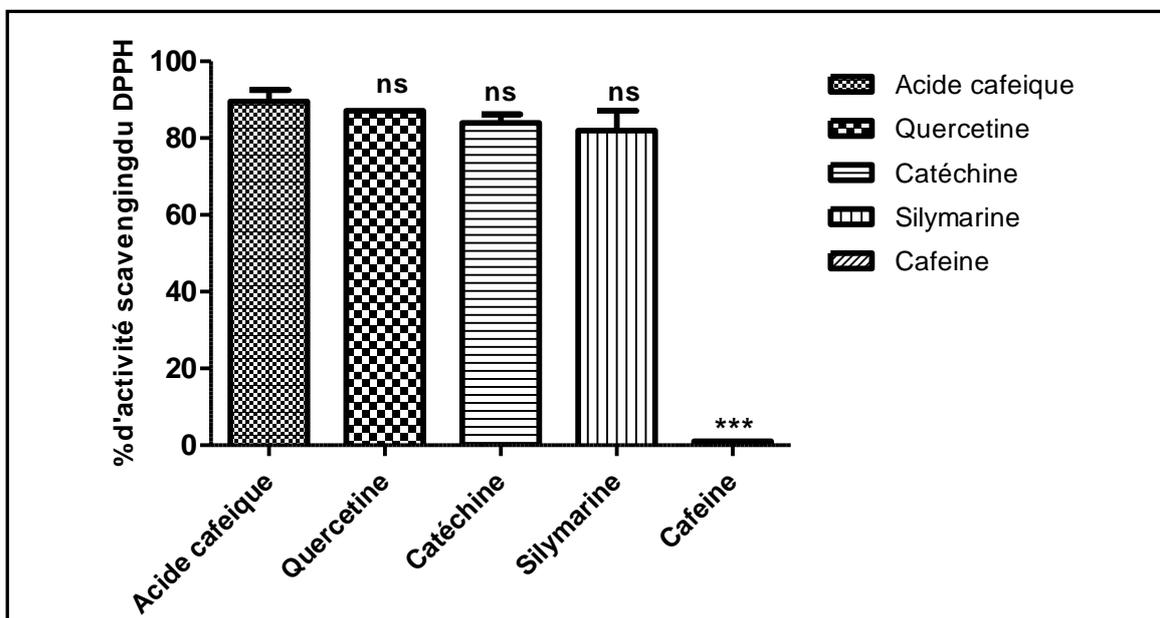
### III.1. Évaluation de l'activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Popovici *et al.*, 2009).

#### III.1.1. Résultats du test du pouvoir anti radicalaire par DPPH'

L'activité antioxydante des différents composés a été évaluée par la méthode de réduction du radical DPPH' afin de tester et de déterminer la concentration des composés les plus actifs.

Dans un premier temps, la concentration des différents composés a été fixée à 100 µg/ml pour estimer leur activité antioxydante, les résultats ainsi obtenus sont représentés dans la figure ci-dessous



**Figure 9** : Activité réductrice du radical DPPH• par les molécules testées à une concentration de 100µg/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures  $\pm$  SD et les comparaisons ont été effectuées par rapport à un standard (Acide caféique) ;

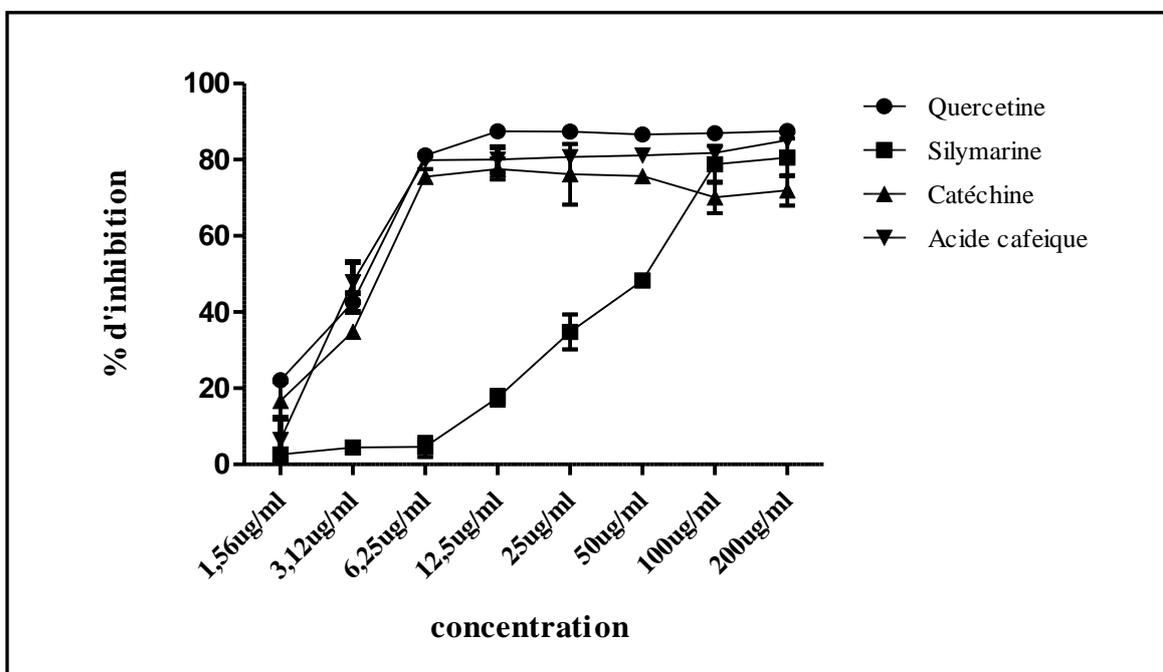
\*\*\* :  $p < 0,001$ ; ns : non significatif.

D'après l'analyse statistique des histogrammes Il a été constaté que les différents composés quercétine, catéchine et silymarine ont montré un effet inhibiteur comparable à celui obtenu avec le standard avec un pouvoir anti-radicalaire supérieur à 80% de l'ordre ( $87,12 \pm 0\%$  ;  $83,97 \pm 2,26\%$  ;  $81,95 \pm 5,17\%$ ) respectivement, à l'exception de la caféine qui n'a présenté aucun effet inhibiteur significatif, ce qui pourrait supposer qu'elle est dépourvue d'activité antioxydante à travers ce test.

Pour suivre le comportement des molécules étudiées une série de dilutions a été préparées à différentes concentrations allant de 1,56-200  $\mu\text{g/ml}$  pour chaque molécule.

La mesure de la densité optique est effectuée pour chaque concentration à une longueur d'onde de 517nm et les valeurs des DO obtenues en fonction de différentes concentrations sont converties en pourcentage d'inhibition par l'application de la formule décrite dans la méthodologie. Ces pourcentages ont permis de tracer des courbes pour chaque composé en fonction des différentes concentrations.

Les graphes ci-dessous représentent la variation du pouvoir antioxydant en fonction de la concentration de chaque molécule (Figure 10).



**Figure 10** : Courbes représentative de l'activité antioxydante des molécules étudiées à des concertations de 1,56-200  $\mu\text{g/ml}$  par le test DPPH.

D'après la figure 10 il a été remarqué que les courbes ont la même allure, une relation dose-effet est enregistrée jusqu'à atteindre un plateau, caractéristique d'une activité maximale. Ces profils d'activité anti radicalaire obtenus révèlent que les composés étudiés possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante.

L'activité antioxydante des composés analysés est exprimée en IC<sub>50</sub> ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH, et plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite plus les composés sont considérés comme des antioxydants puissants (Popovici *et al.*, 2009).

La capacité antioxydante IC<sub>50</sub> des molécules analysées est rassemblée dans le tableau, ci-dessous

**Tableau III** : Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des molécules testées du test DPPH

Echantillons	IC <sub>50</sub> ug/ml
Quercétine	0,255
Silymarine	49,18
Catéchine	0,003
Acide caféique	0,0001

Les résultats du potentiel anti radicalaire de DPPH• montrent que les composés purs examinés ont exhibé des valeurs d'IC<sub>50</sub> faibles (IC<sub>50</sub> Catéchine=0,003 ug/ml et IC<sub>50</sub> Quercétine=0,255 ug/ml) à la seule exception la silymarine qui a montré une valeur d'IC<sub>50</sub> la plus élevée (49,18 ug/ml) par rapport au standard l'acide caféique.

La valeur IC<sub>50</sub> de la silymarine obtenue dans cette étude est comparable à celle rapportée par plusieurs auteurs utilisant le même modèle, Gerhäuser *et al.* (2003) ayant enregistré une valeur de 33,8ug/ml et une IC<sub>50</sub> de 50,4 ug/ml a été obtenu par Šeršeň *et al.* (2006). De même Lu *et al.* (2014) ont trouvé une valeur d'IC<sub>50</sub> de la quercétine d'environ 1,00 ug/ml avec un pourcentage d'inhibition du DPPH de 81,60%.

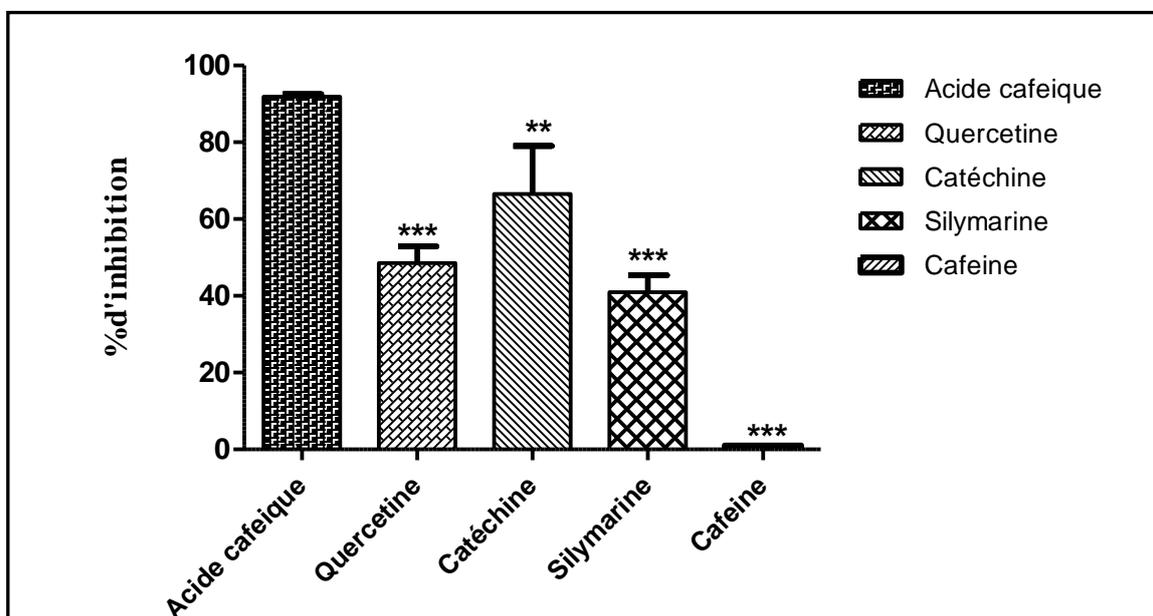
Les résultats issus de cette étude corroborent à ceux déjà mentionnés par Lacopini *et al.* (2008) qui ont montré l'existence d'importantes classes de métabolites secondaires comme les polyphénols dont la catéchine, épicatechine et la quercétine révèlent d'être

d'excellents antioxydants en raison de leurs capacité à protéger les lipoprotéines à faible densité (LDL) contre l'oxydation. À travers cette activité ils jouent aussi un rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire.

Nanjo et al. (1996); Turkmen et al. (2007); Boots et al. (2008) ont également rapporté que la quercétine et la catéchine sont de puissants antioxydants *in vitro* grâce à leurs capacités d'éliminer des espèces hautement réactives telles que le peroxy-nitrite et le radical hydroxyle. Cette capacité antioxydante peut être attribuée à leurs structures aromatiques et à la présence des substituants hydroxyles ce qui leurs confère un rôle de donateurs efficaces d'hydrogène.

### III.1.2. Résultats du test du pouvoir anti radicalaire contre le radical ABTS<sup>+</sup>

Afin de valider les résultats du pouvoir antioxydant des échantillons testés obtenus précédemment par le test du DPPH, nous avons utilisé un deuxième test basé sur la réduction de radical-cation ABTS. Les résultats de l'activité anti radicalaire des échantillons analysés sont exprimés en pourcentage d'inhibition d'ABTS<sup>+</sup> à une concentration de 100 µg/ml (Figure 11).



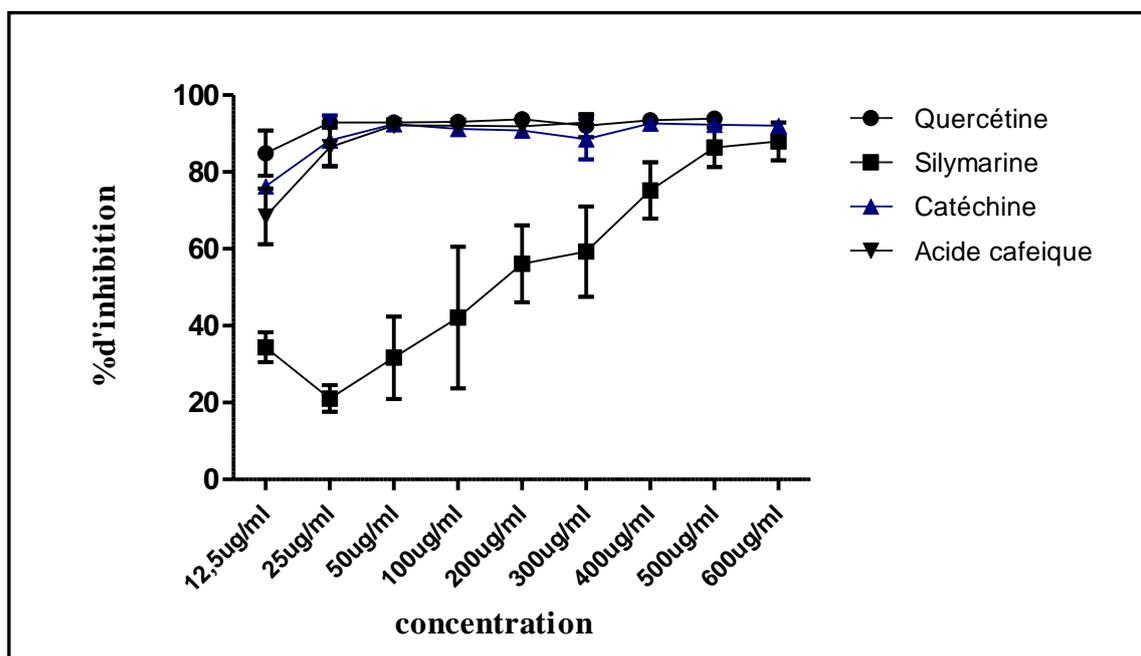
**Figure 11** : Activité réductrice du radical ABTS<sup>+</sup> par les molécules testées à une concentration de 100 µg/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures ± SD et les comparaisons ont été effectuées par rapport à un standard (Acide caféique) ;

\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Les histogrammes présentent les pourcentages de l'activité antioxydante des composés testés vis-à-vis du radical cation ABTS. Parmi les quatre molécules analysées la catéchine a exhibé le pouvoir anti radicalaire le plus élevé ( $66,50 \pm 12,5\%$ ) suivie par les deux autres composés quercétine ( $48,54 \pm 4,36\%$ ) et la silymarine ( $40,96 \pm 4,4\%$ ) tandis qu'aucune activité anti radicalaire n'a été enregistrée par la caféine. Ces résultats révèlent une différence très hautement significative  $P < 0,001$  en comparant avec le standard l'acide caféique ( $91,86 \pm 0,68\%$ ).

Afin de suivre la cinétique de réduction de ces composés antioxydants une cascade de dilution allant de 12,5-600 ug/ml a été préparée pour chaque composé et la mesure de la densité optique de l'effet de chaque concentration est effectuée à 734 nm.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction totale des radicaux ABTS (Figure 12).



**Figure 12 :** Courbes représentative de l'activité antioxydante des molécules étudiées à différentes concentrations par le test d'ABTS.

D'après les courbes de la figure 12 il a été constaté que les composés les plus actifs sont la quercétine et la catéchine, ils inhibent environ 80% de radical ABTS à une concentration de 12,5 ug/ml. L'autre composé relativement actif est la silymarine, avec un pourcentage d'inhibition de 39% à la même concentration.

Les valeurs des concentrations qui inhibent 50% du radical ABTS sont présentées dans le tableau suivant

**Tableau IV** : les valeurs d'IC<sub>50</sub> des molécules testées du test ABTS

Echantillons	IC <sub>50</sub> ug/ml
Quercétine	0,002
Silymarine	1139
Catéchine	0,002
Acide caféique	0,0006

Selon les résultats enregistrés, la catéchine et la quercétine sont dotés d'un pouvoir antioxydant équivalent dont la valeur IC<sub>50</sub> est de l'ordre de 0,002 ug/ml mais relativement faible par rapport à de l'acide caféique dont la valeur est de l'ordre de 0,0006 ug/ ml. Quant à la silymarine, elle a montré l'IC<sub>50</sub> la plus élevée.

Expérimentalement, les propriétés antioxydantes des molécules examinées sont évaluées en utilisant le radical stable DPPH et ABTS à titre comparatif des deux tests

- DPPH :  $AAR_{\text{Catéchine}} > AAR_{\text{Quercétine}} > AAR_{\text{Silymarine}}$
- ABTS :  $AAR_{\text{Quercétine}} \geq AAR_{\text{Catéchine}} > AAR_{\text{Silymarine}}$

La catéchine et la quercétine sont les molécules les plus actives , cela nous permet de suggérer que le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le radical dépend de la conformation structurale de l'antioxydant en particulier de la présence des groupements hydroxyle (OH) libre ainsi le nombre, la position et la nature des substituants sur les cycles B et C (Molyneux, 2004 ; Tsimogiannis et Oreopoulou, 2004).

Plusieurs auteurs ont rapporté la relation structure-activité scavenging des polyphénols et ont trouvé que leur activité antioxydante dépendait du nombre des groupes hydroxyles (Okawa *et al.*, 2001), dans une autre étude il a été également rapporté que les groupements fonctionnels présents dans les composés phénoliques en général peuvent céder facilement un électron ou un proton pour neutraliser les radicaux libres (Chen et Ho, 1995).

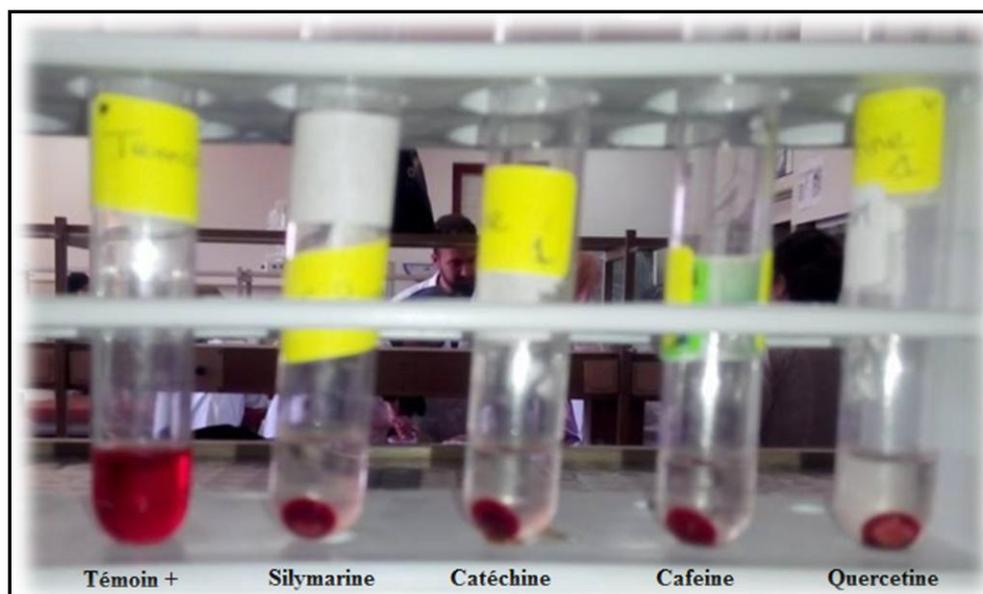
### III.2. Étude de la cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges

Certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent présenter à forte dose une menace pour la santé humaine, dans ce contexte nous sommes intéressés à l'étude de la toxicité de molécules pures analysées à une concentration de 500 et 1000 µg/ml.

Cette étude est faite en se basant sur une comparaison macroscopique de chaque solution en fonction de son aspect, la couleur du culot et du surnageant, et une étude microscopique qui s'intéresse à la morphologie (forme, taille) des hématies.

#### ➤ Observation macroscopique

Une observation macroscopique des différents tubes est faite directement par une simple visualisation à l'œil nu en comparaison à un tube d'hémolyse total provoqué par une solution hypotonique d'NaCl (0,2%) (Figure 13).



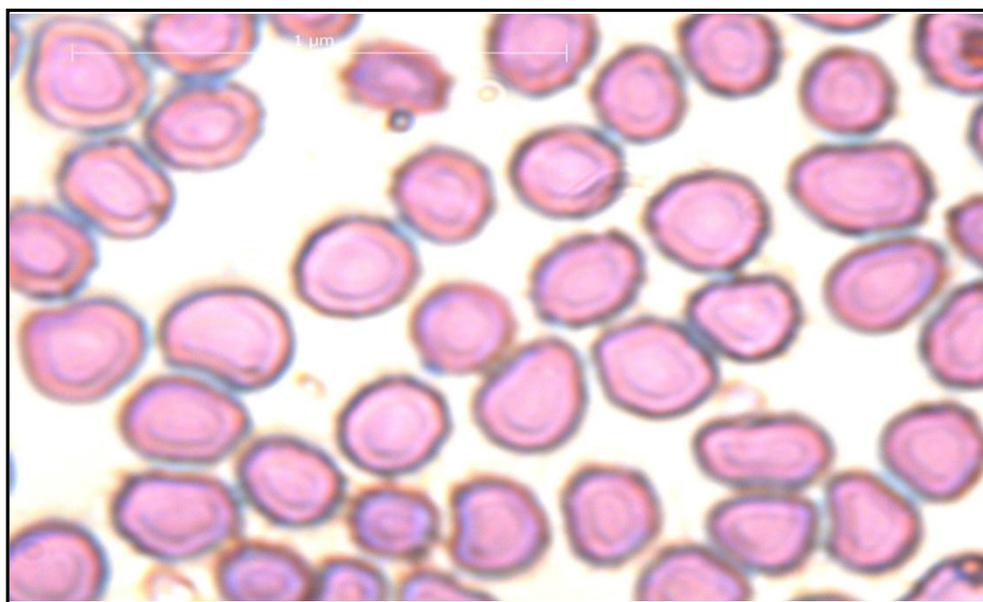
**Figure 13 :** Aspect macroscopique de l'effet anti-hémolytique (**originale**).

Comme la figure l'illustre les différentes molécules testées présentent un surnageant incolore avec présence d'un culot rouge qui est dû aux hématies qui sont restés intacte indiquant l'absence de la fuite d'hémoglobine contrairement au tube témoin positif où le surnageant est d'aspect rouge homogène et limpide ce qui s'explique par la lyse et l'éclatement des globules rouges et par conséquent la libération de l'hémoglobine. Afin de valider les résultats obtenus par les observations macroscopiques nous avons jugé la nécessité d'évaluer les éventuels changements morphologiques au niveau des globules rouges.

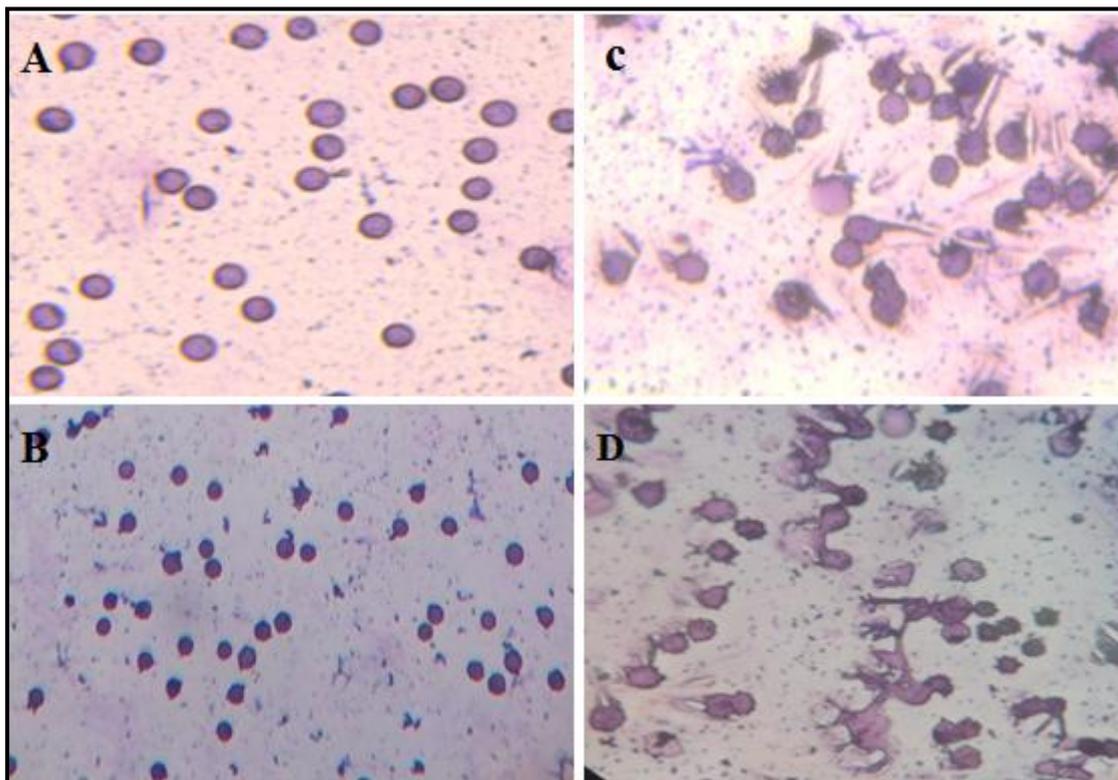
➤ **Observation Microscopique**

Les observations par microscope optique ont permis de mettre en évidence une morphologie érythrocytaire saine (état physiologique) avec absence de tout signe d'affections en présence de molécules testées à différentes concentrations 500-1000ug/ml.

Toutes les lames des composés analysés ont présenté des cellules érythrocytaires analogues avec une même taille, même forme et même couleur, tandis que la lame de contrôle positif a montré des hématies éclatée avec une membrane lysée accompagné d'un diversement leurs contenue (hémoglobine) (Figure 14, 15).



**Figure 14** : Etude morphologique des globules rouges sur frottis sanguin en absence des composés étudié ( $\times 100$ ) (**Originale**).



**Figure 15** : Etude morphologique des globules rouges sur frottis sanguin en présence des composés étudiés à différentes concentrations avec un contrôle positif. (A) cellules incubées avec 500 ug/ml de quercétine ; (B) cellules incubées avec 1000 ug/ml de quercétine; (C) et (D) cellules incubées dans une solution NaCl à 0.2% ; ces observations sont valables pour les autres composés ( $\times 40$ ) (**Originale**).

La morphologie érythrocytaire obtenue en examen microscopique s'accorde avec l'aspect visualisé à l'œil nu qui ne présente aucun effet hémolytique.

À la lumière de ces deux résultats nous pouvons suggérer que les composés étudiés à une concentration de 500ug/ml et 1000ug/ml n'ont révélé aucune toxicité vis-à-vis des globules rouges humain.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de **Wellington et Jarvis, (2001)** qui ont soulevé qu'aucune recherche ne mentionne la présence d'une toxicité induite par la silymarine. D'autres études expérimentales réalisées sur des souris viennent confirmer que la silymarine ne présente aucune toxicité significative à des doses orale allant de 2500 à 5000 mg/kg (**karimi et al., 2011**).

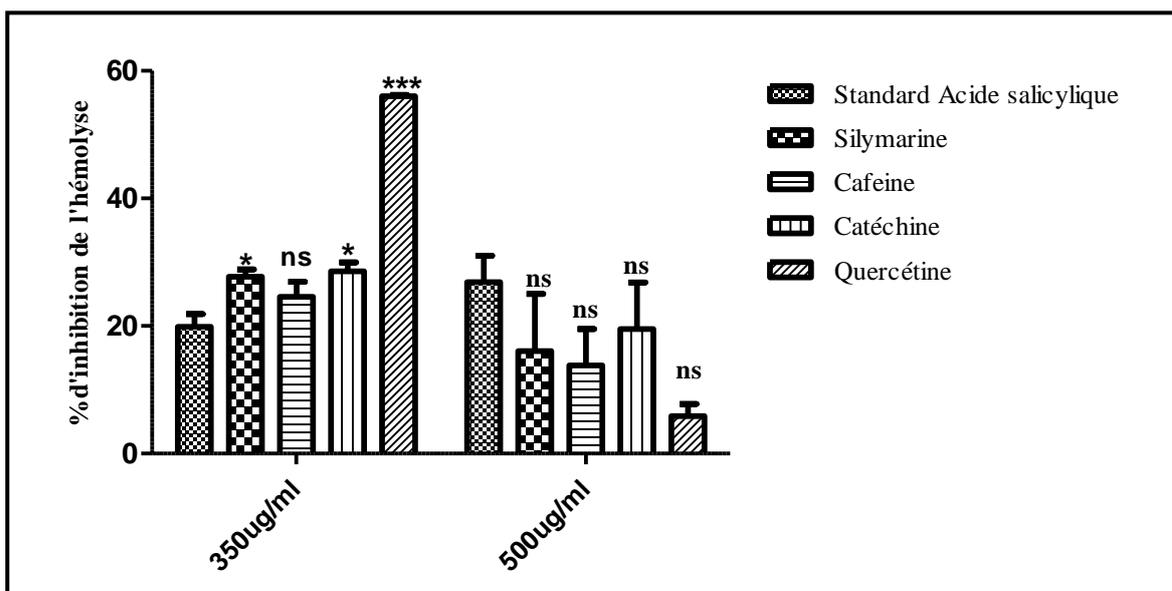
Dans une étude réalisée par **Dunnick et Hailey, (1992)** sur des rats F344/N mâles et femelles il a été rapporté que la quercétine administrée à une dose de 40 à 1900 mg/kg/jours n'a révélé aucun signe de toxicité sur les animaux.

### III.3. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

#### III.3.1. Hémolyse induite par un choc hypotonique

Dans le but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de quelques molécules pures, nous avons suivi la méthode de la stabilisation membranaire des cellules. Les globules rouges ont été utilisés comme modèle.

Les valeurs de la DO obtenues après 30 min d'incubation des échantillons sont converties en pourcentages d'inhibition de l'hémolyse, ces pourcentages sont rapportés dans la figure ci-dessous



**Figure 16** : Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par un choc hypotonique aux concentrations de 350 et 500 µg/ml de molécules testées. Les valeurs présentent les moyennes  $\pm$  SEM (n = 5). Les comparaisons ont été effectuées par rapport à un standard (Acide salicylique) ; \* :  $p < 0,05$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ; ns : non significatif.

Les résultats enregistrés ont montré que toutes les molécules analysées présentent une activité inhibitrice de l'hémolyse des érythrocytes humains à des taux variables par comparaison à celle obtenue pour l'acide salicylique.

À une concentration de 350 ug/ml la quercétine a exercé un effet inhibiteur hautement significatif ( $P < 0.001$ ) avec un pourcentage d'inhibition le plus puissant de ( $56 \pm 0,21\%$ ) deux fois plus que le standard. Tandis que la silymarine, la caféine et la catéchine ont présenté des pourcentages relativement comparables ( $27,7 \pm 1,1\%$ ,  $24,5 \pm 2,3 \%$ ,  $28,5 \pm 1,3\%$ ) respectivement.

En revanche, à une concentration de 500 ug/ml il a été observé un effet anti-hémolytique le moins important avec une diminution de l'activité de la quercétine au voisinage de ( $5,8 \pm 1,8\%$ ) suivie par la caféine, la catéchine et la silymarine qui ont présenté des pourcentages un peu plus élevés de l'ordre de ( $13 \pm 5,7\%$ ;  $19 \pm 7,3\%$  et  $16,06 \pm 8,9\%$ ) respectivement. Ceci peut être expliqué par un encombrement stérique ou bien dû à l'effet biphasique c'est-à-dire qu'à une concentration relativement faible les composés analysés protègent les érythrocytes humains, cependant à de fortes concentrations ils provoquent la diminution de cette protection, cela indique que l'effet de stabilisation des membranes n'est pas dose dépendant. Ces résultats concordent avec les études antérieures des **Houcher et al. (2001)**; **Hema, (2014)**.

Il est bien clair que les molécules testées ont exhibé un effet inhibiteur de l'hémolyse induite par une solution hypotonique de ce fait il est à estimer que le pourcentage d'inhibition le plus élevé reflète une meilleur stabilisation membranaire dans cette circonstance le composé testé à une forte activité anti-inflammatoire.

Plusieurs études menées *in vitro* ont montré, l'effet des extraits de plantes médicinales sur la stabilisation des membranes érythrocytaires en raison de leur richesse en composés phénoliques qui couvrent une gamme très large d'activités biologiques.

les résultats obtenus vont dans le même sens que ceux de **karimi et al. (2011)** et **Marouf et al. (2011)** qui ont démontré que la silymarine présente des activités de cytoprotection grâce à ces propriétés antioxydantes qui favorisent l'augmentation de la superoxyde dismutase et le glutathion peroxydase dans les érythrocytes. En effet l'action de la silymarine sur les érythrocytes s'explique par l'incorporation de la silibinine dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire conduisant à une réduction de l'hémolyse par

conséquent la protection contre la lyse. Dans une étude menée par **Pawlikowska-Pawlega et al. (2003)** l'effet de la quercétine sur les propriétés de la membrane érythrocytaire a été étudié, et les auteurs ont rapporté que la quercétine protège la membrane contre la peroxydation lipidique lorsqu'elle se localise près de sa surface.

**García-Lafuente et al. (2009)** ont mentionné que les flavonoïdes sont doués de puissantes activités anti-inflammatoires qui s'exercent à travers plusieurs mécanismes y compris l'élimination d'éventuelle espèce réactive de l'oxygène, l'inhibition de la production d'eicosanoïde par modulation des activités de l'acide arachidonique et des enzymes métaboliques ainsi que la modulation de l'expression génique des molécules pro inflammatoires conduisant ainsi à l'atténuation de l'inflammation.

De même **Bennett et ses collaborateurs, (1980)** ont montré que plusieurs flavonoïdes étaient capables d'inhiber la libération des enzymes lysosomales des neutrophiles de lapin.

## *CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

Ces dernières années, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes, considérés comme une véritable usine chimique dont il faut tirer le maximum de profit.

Ce présent travail a pour objectif l'étude de l'effet anti-inflammatoire de quatre composés purs la caféine, la catéchine, la silymarine et la quercétine largement distribués dans l'espèce végétale. Ainsi nous avons dans un premier temps mis en place l'activité anti radicalaire à travers la capacité de piégeage des radicaux libres par l'application de deux tests DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup>.

Selon les résultats obtenus, nous pouvons avancer que les molécules examinées ont présenté une inhibition importante vis-à-vis du radical DPPH et ABTS dont les meilleurs résultats sont ceux obtenus pour la quercétine et la catéchine.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée selon la méthode de l'inhibition de l'hémolyse induite par le choc hypotonique, les résultats obtenus mettent en évidence un potentiel anti-inflammatoire des composés testés à de faibles doses.

Les résultats obtenus sont en faveur d'une activité anti-inflammatoire des composés purs examinés sur la lyse des membranes érythrocytaires, ainsi ces derniers pourraient limiter la réponse inflammatoire causée par la libération des enzymes lysosomales des neutrophiles activés à travers une stabilité de la membrane des lysosomes.

Ce travail reste préliminaire et ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances pures responsables d'activité anti-inflammatoire et nécessite encore des investigations complémentaires pour identifier le mécanisme réel par lequel ces molécules agissent sur la stabilité membranaire des érythrocytes isolés du sang humain. Pour cela il est intéressant d'approfondir cette étude par des tests d'évaluation de l'effet synergique entre ces molécules.

## *RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

### A

**Albert, B. (2003).** L'essentiel de la biologie moléculaire de la cellule. Paris : *Flammarion/Médecine-Sciences*, p. 35.

### B

**Baird, S-K., Kurz, T., et Brunk, U-T. (2006).** Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochemical Journal*, 394(1), 275-283.

**Barnes, P-J. (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science*, 94(6), 557-572.

**Barton, G-M. (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 413-420.

**Bayne, B-L., Brown, D-A., Burns, L et Dixon, D-R. (1985).** The effects of stress and pollution on marine animals. Preager Publishers, New York.

**Bennett, J-P., Gomperts, B-D., et Wollenweber, E. (1980).** Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. *Arzneimittel-Forschung*, 31(3), 433-437.

**Bidaut-Russell, M., et Gabriel, S-E. (2001).** Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15(5), 739-753.

**Boots, A-W., Haenen, G-R., et Bast, A. (2008).** Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 585(2), 325-337.

**Borel, J-P., Monboisse, J-C., et Bellon, G. (1988).** Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés. *Médecine/sciences*, 5, 304-310.

**Botting, R-M., et Botting, J-H. (2000).** Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clinical Drug Investigation*, 2(19), 1-7.

C

**Canaud, B., Sénécal, L., Leray-Moragués, H., Picard-Gontiers, A., Terrier, N., Morena, M., et Cristol, J-P. (2003).** L'accès vasculaire, une cause d'inflammation sous-estimée chez l'hémodialysé. *Néphrologie*, 24(7), 353-358.

**Cavaillon, J-M. (1993).** Cytokines et inflammation. *Animal Science Journal*, 66(1), 262.

**Chakravarti, A., Allaey, I., et Poubelle, P-E. (2007).** Neutrophile et immunité-Est-ce inné ou acquis ? *médecine/sciences*, 23(10), 862-867.

**Charles, N-S., Peter, A-W et Derek, W-G. (2010).** Fundamentals of inflammation. *Cambridge University Press*, p.2-3.

**Chen, C-W., et Ho, C-T. (1995).** Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of food lipids*, 2(1), 35-46.

**Ciechanover, A. (2005).** Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin–proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 44(37), 5944-5967.

**Coujard, R et Poirier, J. (1980).** Précis d'Histologie Humain. Paris: *Masson*, p.69-73.

D

**Dunnick, J-K., et Hailey, J-R. (1992).** Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundamental and Applied Toxicology*, 19(3), 423-431.

F

**Freeman, L. (2003).** Soleil et système immunitaire : il faut renforcer les défenses antioxydantes. *Nutranews Science, Nutrition, Prévention et Santé*. p. 1-23.

G

**García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., et Martínez, J-A. (2009).** Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9), 537-552.

**Gaziano, J-M., et Gibson, C. M. (2006).** Potential for drug–drug interactions in patients taking analgesics for mild-to-moderate pain and low-dose aspirin for cardioprotection. *The American journal of cardiology*, 97(9), 23-29.

**Ge, W., Li, D., Gao, Y., et Cao, X. (2014).** The roles of lysosomes in inflammation and autoimmune diseases. *International reviews of immunology*, 34(5), 415-431.

**Gerhäuser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauff, J., et Frank, N. (2003).** Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 163-172.

### **H**

**Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22), 2831-2846.

**Hema, K. (2014).** *In vitro* anti-inflammatory activity of quercitrin isolated from *allamanda cathartica* linn. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(4), 440-445.

**Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., et Latz, E. (2008).** Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology*, 9(8), 847-856.

**Houcher, B., Naimi, D., Kebir, N., Abbaoui, N., et Begag, S. (2001).** Effet des vitamines B12, B9 et B6 et leurs interactions sur la fragilité osmotique des erythrocytes humains. *Sciences & Technologie A*, 15, 105-108.

**Hochschild, R. (1971).** Lysosomes, membranes and aging. *Experimental gerontology*, 6(2), 153-166.

### **J**

**Janssens, G. (2009).** Répertoire d'analyses de biologie clinique. Paris : *Institut de Biologie clinique*, p.5-6.

**K**

**Karimi, G., Vahabzadeh, M., Lari, P., Rashedinia, M., et Moshiri, M. (2011).** “Silymarin”, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iranian journal of basic medical sciences*, 14(4), 308-317.

**Kindt, T-J. Goldsby, R.A. et Osborne, B.A. (2008).** Immunologie. 6<sup>ème</sup> édition, *Dunod*, Paris, p. 67-68.

**L**

**Lacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., et Sebastiani, L. (2008).** Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 589-598.

**Lekeux, P. (1991).** Pharmacodynamie des AINS. In : Le grand livre des AINS. ségré : Edition. Schering plough santé animales, p. 29-37.

**Lévy, J-P., Varet, B., Clauvel, J-P., Lefrere, F., Bezeaud, A., et Guillin, A. (2001).** Hématologie et transfusion. Paris : *Masson*, p. 21-22.

**Lipsky, P-E., Brooks, P., Crofford, L. J., DuBois, R., Graham, D., Simon, L-S., et Abramson, S-B. (2000).** Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Archives of Internal Medicine*, 160(7), 913-920.

**Lu, Y., Shipton, F-N., Khoo, T-J., et Wiart, C. (2014).** Antioxidant activity determination of Citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods. *Pharmacology & Pharmacy*, 4(5), 395-400.

**M**

**Maire, I. (2012).** Le système lysosomal dans la protéolyse : panorama des maladies lysosomiales. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 196(8), 1561-1574.

**Male, D., Roitt, Y., Brostoff, J et Roth, D-B. (2007).** Mécanisme de l'immunité innée. In : Immunologie. France: *Masson*, p. 155.

- Mansour, S., Djebli, N., Ozkan, E-E et Mat, A. (2014).** In vivo anti-inflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabroides*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **7**, 514-520.
- Marouf, B-H., Zalzal, M-H., Al-Khalifa, I-I., Aziz, T. A., et Hussain, S-A. (2011).** Free radical scavenging activity of silibinin in nitrite-induced hemoglobin oxidation and membrane fragility models. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **19(3)**, 177-183.
- Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Andoh, T., et Nakata, M. (1999).** Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, **47(4)**, 1749-1754.
- Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q-L., Tsien, R-Y., et Reed, J-C. (2000).** Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature cellbiology*, **2(6)**, 318-325.
- Mégarbane, B., Deye, N., et Baud, F. (2007).** Foie toxique : mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques. *Réanimation*, **16(7)**, 632-642.
- Middleton, E et Drzewiecki, G. (1984).** Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochemical pharmacology*, **21(33)**, 3333-3338.
- Mittal, M., Rizwan-siddiqui, M., Tran, K., Sekhar-reddy, P et Asrar, M. (2014).** Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Comprehensive invited review*, **7(20)**, 1126-1167.
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **26(2)**, 211-219.

N

**Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., et Hara, Y. (1996).** Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(6), 895-902.

**Ndiaye, M., Gy, S. Y., Dièye, A. M., Touré, M., et Faye, B. (2006).** Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'annonareticulata (annonaceae) sur l'œdème aigu de la patte de rat indidit par la carragénine. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 14, 179-186.

O

**Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., et Masateru, O-N-O. (2001).** DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(10), 1202-1205.

**Orliaguet, G., Gall, O., et Benabess-Lambert, F. (2013).** Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*, 17(5), 228-237.

**Ouédraogo, N., Lompo, M., Sawadogo, R-W., Tibiri, A., Hay, A. E., Koudou, J., et Guissou, I-P. (2012).** Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpuserinaceus*Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*, 10(5), 286-292.

P

**Pawlikowska-Pawłęga, B., Gruszecki, W-I., Misiak, L-E., et Gawron, A. (2003).** The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemical pharmacology*, 66(4), 605-612.

**Prine, L. (1996).** Mast cells, Basophils, eosinophils. Analyse of laboratory markers. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 8(36), 889-896.

**Popovici, C., Saykova, I., et Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de genie industriel*, 4, 25-39.

**R**

**Rankin, J-A. (2004).** Biological mediators of acute inflammation. *American Association of Critical-Care Nurses Clin Issues*, 15(1), 3-17.

**Rao, P., et Knaus, E-E. (2008).** Evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 81-110s.

**Rather, L-J. (1971).** Disturbance of function (functiolaesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 47(3), 303-322.

**Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., et Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.

**Russo-Marie, F., Peltier, A-P., et Polla, B-S. (1998).** L'inflammation. Paris. *John Libbey Eurotext*, p. 523-553.

**S**

**Sadique, J., AL-Rqobahs, W-A., et Bughaith EI-gindi, A-R. (1989).** The bioactivity of certain medicinal plants on the stabilization of RBS membrane system. *Fitoterapia*, (60), 525-532.

**Sakat, S., Juvekar, A-R., et Gambhire, M-N. (2010).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. I. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 146-155.

**Sánchez-Moreno, C. (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Revista de Agarquímica y Tecnología de Alimentos*, 8(3), 121-137.

**Šeršeň, F., Vencel, T., et Annus, J. (2006).** Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylicetyl radicals. *Fitoterapia*, 77(7), 525-529.

- Sébahoun, G. (2005).** Hématologie clinique et biologique. France : *Arnette*, p.78.
- Silbemagi, S et Lang, F. (2000).** Atlas de poche de physiopathologie. France : *Flammarion Médecine-Science*, France. p.48.
- Singer, S-J et Nicolson, G-L. (1972).** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Schorn, C., Frey, B., Lauber, K., Janko, C., Strysio, M., Keppeler, H., Gaipl, U.S., Voll, R.E., Springer, E., Munoz, L.E. (2011).** Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *The Journal of biological chemistry*, **286(1)**, 35-41.
- Smaili F. (2008).** Abrégé d'hématologie. Office des publications universitaires : Alger. p. 26-34.
- Sultan, C., Gouault-heilmann, M et Imbert, M. (1987).** Aide-mémoire d'hématologie. Paris VI : *Flammarion Médecine-Science*, p.16.

### T

- Tsimogiannis, D-I., et Oreopoulou, V. (2004).** Free radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7, 3', 4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **5(4)**, 523-528.
- Turkmen, N., Velioglu, Y-S., Sari, F et Polat, G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, **12(3)**, 484-496.

### U

- Umukiro S., et ashorobi, R-B. (2006).** Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing property of aqueous leaf extract of *Momordica charantia* in rats. *African Journal of Biomedical Research*, **2(9)**, 119-124.

W

**Wajcman, H., Lantz, B., Girot, R., et Bernard, J. (1992).** Les maladies du globule rouge. Paris : *INSERM/Médecine-Science Flammarion*, p 45.

**Wallace, M et Staats P-S. (2004).** Pain medicine and management: just the facts. New York: *Mc Graw-Hill*, p.48.

**Weill, B et Batteux, F. (2003).** Immunopathologie et réaction inflammatoire. France: *De Boeck Supérieur*, p.12.

**Wellington K et Jarvis B. (2001).** Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. *Bio Drugs*, 15(7), 465–489.

**Weissmann, B-G. (1967).** The role of lysosomes in inflammation and disease. *Annual Review of Medicine* , 18(1), 97-112.

Y

**Yoshihiko, O. (1976).** Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot-oedema. *Biochem. Pharmacol*, 25(13), 1465-1472.

**Yougbaré-Ziébrou, M-N., Ouédraogo, N., Lompo, M., Bationo, H., Yaro, B., Gnoula, C., Sawadogo, W-R et Guissou I-P. (2015).** Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 14(4), 213-219.

[Anonyme<sup>1</sup>] : (<https://www.e-pansement.fr/actualites/freiner-l'inflammation-pour-accelerer-la-cicatrisation>)

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire d'une variété de molécules pures d'origine végétale en utilisant des tests *in vitro*. Dans un premier temps l'effet antioxydant a été évalué en utilisant le test de DPPH et ABTS, la catéchine et la quercétine ont montré un effet piègeur remarquable vis-à-vis du radical DPPH avec des  $IC_{50}$  de 0,003  $\mu\text{g/ml}$  et 0,255  $\mu\text{g/ml}$  respectivement comparable au standard, ces deux molécules possèdent également une activité réductrice du radical cation ABTS avec des  $IC_{50}$  équivalentes de l'ordre de 0,002  $\mu\text{g/ml}$ . D'autre part les résultats de l'activité anti inflammatoire montrent que ces molécules possèdent un effet protecteur contre l'hémolyse hypotonique dose non dépendant avec une meilleure efficacité par rapport à celle de l'anti-inflammatoire non stéroïdien.

Les résultats obtenus pour le test de cytotoxicité ont également montré clairement que ces molécules ne présentaient aucun effet toxique sur les érythrocytes humains.

Il ressort de cette étude que les molécules testées présentent un potentiel anti-inflammatoire à travers le modèle utilisé.

**Mots clés :** anti-inflammatoire, hémolyse hypotonique, cytotoxicité, antioxydants, érythrocytes..

## Abstract

This study was designed to investigate the anti-inflammatory activity of a variety of pure molecules of plant origin *in vitro*. Initially the antioxidant effect was evaluated using the DPPH and ABTS tests, the catechin and quercetin showed a remarkable scavenging effect against the DPPH radical With  $IC_{50}$  of 0.003  $\mu\text{g/ml}$  and 0.255  $\mu\text{g/ml}$  respectively comparable to the standard, these two molecules also have a significant inhibitory activity of the ABTS radical cation with  $IC_{50}$  equivalent of about 0.002  $\mu\text{g/ml}$ . On the other hand, the results of the anti-inflammatory activity show that these molecules have a protective effect against hypotonic hemolysis of non-dependent dose with a better efficiency compared to that of the non steroidal anti-inflammatory.

The results obtained from the cytotoxicity test have also clearly showed that these molecules had no toxic effect on human erythrocytes. From this study, it appears that the molecules tested have an anti-inflammatory through the model used

**Keywords:** anti-inflammatory, hypotonic hemolysis, cytotoxicity, antioxidant, erythrocytes.

## ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للالتهابات لمجموعة متنوعة من جزيئات نقية مشتقة من النباتات على الخلايا في المخبر. اولاً تم تقييم تأثير مضاد للأوكسدة باستخدام اختبار DPPH و ABTS وقد أظهرت كل من كاتشين وكيرسيتين تأثير كسح ملحوظ على جذر DPPH مع قيم  $IC_{50}$  حوالي 0,003 ميكروغرام/مل و 0,255 ميكروغرام/مل على التوالي مقارنة مع المعيار، لدى هاتين الجزيئتين أيضاً نشاط مثبط كبير للأيونات الموجبة ABTS مع  $IC_{50}$  حوالي 0,002 ميكروغرام/مل متعادل من جهة أخرى بينت نتائج مضاد الالتهاب أن الجزيئات تملك تأثير وقائي ضد انحلال الدم بواسطة التوتر المنخفض مع أفضل كفاءة مقارنة مع مضادات الالتهاب الستيرويدية كما أظهرت أيضاً نتائج فحص السمية بوضوح أن هذه الجزيئات ليس لديها أي تأثير سام على خلايا الدم البشرية، من هذه الدراسة يستخرج ان الجزيئات المدروسة لديها قدرة مضادة للالتهاب من خلال النموذج المدروس.

**الكلمات المفتاحية:** مضادات الالتهاب، انحلال الدم منخفض التوتر، سمومية الخلايا، مضادات الأوكسدة، كريات الدم الحمراء.