

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences biologiques et des sciences agronomiques
Département de Biochimie Microbiologie Contrôle de qualité
Filière : Biologie
Option : Biochimie appliquée

Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme Master en biochimie appliquée

Thème

Effet d'un extrait acétonique de raisin *Vitis vinifera* variété sultanine sur quelques fonctions du neutrophile humain

Présenté par :

M^{me} GRIM Dyhia et M^r OUKIL Smail

Soutenu publiquement le : 16 juillet 2019

Devant Le Jury :

Présidente	M ^{me} SI AHMED S.	Maître de conférences B	UMMTO
Promotrice	M ^{me} BEDOUHENE S.	Maître de Conférences B	UMMTO
Co-promotrice	M ^{me} LADJ K.	Maître assistante classe A	U. Bejaia
Examinatrice 1	M ^{me} SENNANI N.	Maître de Conférences B	UMMTO
Examinatrice 2	M ^{me} ALMI D.	Maître de Conférences B	UMMTO

Année : 2018-2019

Remerciements

Louange au Dieu le tout puissant qui nous a accordé la foi, le courage et la patience pour mener ce travail à terme.

*Nous tenons à remercier infiniment M^{me} **BEDOUHENE S.** maître de conférences classe B, pour nous avoir proposé ce sujet de mémoire, pour sa patience et ses conseils précieux. Permettez-nous Mme de vous exprimer nos remerciements les plus sincères pour votre encadrement scientifique. On remercie infiniment M^{me} **LADJ K.** pour avoir énormément contribué à la réalisation de notre travail et pour ses pertinentes corrections.*

*Nos remerciements vont également à M^{me} **SI AHMED S.** maître Assistant B à L'UMMTO pour avoir accepté de présider et à participer à notre jury de mémoire.*

*Nous présentons nos remerciements à M^{me} **SENNANI N.** Maître de Conférences B à L'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner et de participer à notre jury de mémoire.*

*Nous remercions aussi M^{me} **ALMI D.** Maître de Conférences B à L'UMMTO pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Nos plus sincères remerciements vont également au professeur M^r **MATI A.** directeur du laboratoire LABAB pour toutes les conditions de travail et le matériel qu'il a pu nous conférer afin de réaliser notre projet, et aussi sur les connaissances et les conseils qu'il nous a transmis au cours de notre formation.*

*Nous présentons nos remerciements au professeur M^r **HOUALI K.** qui a mis son laboratoire à notre disposition.*

Nos remerciements sont destinés aussi à tous les membres du laboratoire pour leur gentillesse et leur aide précieuse, ils nous ont permis de mener à bien ce travail.

*Nos Vifs remerciements vont à M^{me} **TAOURI- BELKHALFA S.** chef de service du laboratoire d'analyse médicale au sein de la polyclinique **NABILA DJAHNINE** pour son aide et tout ce qu'elle nous a conférée pour la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'achèvement de ce travail, notamment nos amis **CYSSY, NABIL, SALIM, ALI, CHERIF, OMAR, TAOUS, TAREK, BILOU, LEILA, REZIKA, ASSIA, YASSMIN, SONIA, LOUIZA, MOUSSA, DJAMILA, LYLIA, LIZA.***

Dédicaces

Je dédie ce travail.

- *À mes chers parents. Qui m'ont toujours conseillé et orienté. Les mots expressifs soient-ils restent faibles pour exprimer mon éternelle gratitude. Que dieu vous protège et vous garde pour nous.*
- *À mes frères : SAMIR et MENAD, vous étiez et vous restiez mon soutien dans la vie*
- *À mes sœurs du cœur : HAKIMA, DALILA, OUARDA, SOUHILA.*
- *À ma moitié, mon mari AZIZ. Qui m'a encouragé et soutenu tout le long de mon travail.*
- *À ma petite fille trésor MELISSA, tu es la prunelle de mes yeux*
- *À ma belle famille, MEROUK : Mon beau père et ma belle-mère, à mes belles-sœurs et mes beaux-frères.*

DYHIA

Dédicaces

Je dédie ce travail

-A mes chers parents : Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.

-Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

-A mes deux grands frères MOH-SAID et SAID. Et a toute la famille OUKIL et BOUAZIZ. -A tous mes amis et toute ma promotion de biochimie appliquée. Et toute personne qui m'ont encouragée et m'ont donné de l'aide dans ce travail.

SMAIL

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des tableaux et figures	
Introduction générale	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Les polynucléaires neutrophiles.	
1.1. Description des neutrophiles	2
1.2. Les propriétés des neutrophiles	5
1.3. Les fonctions des neutrophiles	6
1.4. Régulation des fonctions des neutrophiles	9
1.5. Dysfonctionnement des neutrophiles	10
Chapitre II : <i>Vitis vinifera</i>.	
2.1. La description de la vigne et du raisin	11
2.2. Composition biochimique du raisin <i>Vitis vinifera</i>	12
2.3. Les intérêts de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	13
PARTIE EXPERIMENTALE	
1. Matériel et méthodes	
1.1. Matériel	15
1.2. Méthodes	16
1.2.1. Isolement des neutrophiles	16
1.2.2. Dénombrement des Neutrophiles	18
2. Caractérisation de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	19
2.1. Dosage des polyphénols présents dans l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	19
2.2. Dosage des flavonoïdes présents dans l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	20
2.3. Dosage des sucres réducteurs présents dans l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	20

3. Evaluation de l'effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur la viabilité des neutrophiles	21
4. Evaluation de l'effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur l'adhérence des neutrophiles	22
5. Evaluation de l'effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur la dégranulation des neutrophiles	22
5.1. Induction de la dégranulation des neutrophiles	22
5.2. Dosage des protéines sécrétoires du neutrophile	23
5.3. Evaluation de l'effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur l'activité de la myéloperoxydase	24
2. Résultats et discussion	25
2.1. Isolement des neutrophiles	25
2.2. Caractérisation de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	26
2.2.1. Dosage des polyphénols présents dans l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	26
2.2.2. Dosage des flavonoïdes présents dans l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	26
2.2.3. Dosage des sucres réducteurs présents dans l'extrait de <i>Vitis vinifera</i>	26
2.3. Effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur la viabilité des neutrophiles	27
2.4. Effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur l'adhérence des neutrophiles	29
2.5. Effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur la dégranulation des neutrophiles	31
2.5.1. Dosage des protéines sécrétoires des neutrophiles	32
2.5.2. Effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur l'activité de la myeloperoxydase.....	33
 CONCLUSION.....	 35
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	36
 ANNEXES	

Liste des figures

Figure 1. Morphologie d'un neutrophile observé sous microscopie électronique	2
Figure 2. Différenciation des polynucléaires neutrophiles.	3
Figure 3. Etapes de la migration des neutrophiles activés à travers la paroi endothéliale vasculaire	6
Figure 4. Métabolismes des Formes réactives de l'oxygène	8
Figure 5. Arsenal antimicrobien des neutrophiles.	9
Figure 6. Photo d'une grappe de raisin sultanine.....	12
Figure 7. La structure chimique des polyphénols.....	13
Figure 8. Diagramme représentant les étapes de purification des neutrophiles	17
Figure 9. Comptage des PNs avec une cellule de MALASSEZ observé sous microscope photonique au grossissement X 40.....	18
Figure 10. Boîtes de Petri contenant les différentes dilutions colorées au cristal violet.	23
Figure 11. Morphologie des cellules sanguines révélées au cristal violet sous microscope photonique au grossissement X 100.	25
Figure 12. Morphologie des neutrophiles observés sous microscope photonique au Grossissement X 40.....	25
Figure 13. Dénombrement des neutrophiles observés sous microscope photonique au Grossissement X 40.....	27
Figure 14. Effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur la viabilité des PNs.	28
Figure 15. L'effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur l'adhérence des neutrophiles.....	29
Figure 16. Les neutrophiles adhérents traités à l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> observés sous Microscope inversé au grossissement X 20.....	31
Figure 17. Effet de l'extrait de <i>Vitis vinifera</i> sur la dégranulation des neutrophiles.....	33

Liste des tableaux

Tableau I. Les différents types de granules présents chez le polynucléaire neutrophile.	4
Tableau II. Composition biochimique du raisin	12
Tableau III. Matériels utilisés au laboratoire.	15
Tableau IV. La concentration des protéines sécrétoires des neutrophiles.	32

Liste des abréviations

ATPase	Adénosyl triphosphate
Bcl-2	B-cell leukemia protein-2
BSA	Albumine sérique bovine
C5a	Complément 5a
CD	Cluster de différenciation
CR	Récepteur du Complément
CSH	Cellule souche hématopoïétique
Cys	Cystéine
DNBS	Acide dinitro benzène sulfonique
DSS	Sulfate de dextran sodique
EDTA	Acide ethylene diamine tetra acetique
EQ	Equivalent quercétine
EqGA	Equivalent acide gallique
Fc IIRA	Fragment Fc des immunoglobulines
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenyl alanine
FPR	Recepteur du fMLP
His	Histidine
ICAM-1	Molécule-1 d'adhésion intracellulaire
IL8	Interleukine 8
LFA	Antigène fonctionnel associé aux Lymphocytes
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotriène B4
Mac-1	Macrophage antigen-1
MMP	Métalloprotéinase
MPO	Myéloperoxydase
MS	Matière sèche
NADPH	Oxydase nicotinamide d'adénine dinucléide phosphate
NETs	Filets extracellulaires du neutrophile
NSF	Facteur sensitive N-ethylmaleimide

O ₂ ⁻	Anion superoxyde
PAF	Facteur d'activation des plaquettes
PBS	Tampon phosphate salin
PGMs	Progéniteurs granulocytes-macrophages
PLCs	Progéniteurs lymphoïdes communs
PM	Progéniteur multipotent
PMA	Phorbolmyristate acétate
PMCs	Progéniteurs myéloïdes communs
PMEs	Progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes
TLRs	Toll Like Recepteur
TNBS	Acide trinitro benzène sulfonique
TNF-	Facteur de nécrose tumoral
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
VCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1

Introduction

Les polynucléaires neutrophiles humains (PNs) sont un des pivots de l'immunité innée et constituent un puissant système de défense pour l'homme contre les agents pathogènes, elles sont les premières cellules immunitaires à migrer du sang vers un foyer infectieux par chimiotactisme et englobent les agents pathogènes par phagocytose. Ces phagocytes ont un arsenal de substances microbicides et des hydrolases libérées afin d'hydrolyser et d'éliminer le pathogène phagocyté.

La sur-activation et l'accumulation prolongée des neutrophiles dans le site affecté, peuvent engendrer des substances hautement toxiques telles que les formes réactives de l'oxygène (FRO) qui induisent des dommages et des lésions tissulaires, contribuant à l'apparition des maladies inflammatoires graves. Actuellement plusieurs études sont orientées vers les modulateurs naturels de l'inflammation, entre autres le raisin qui ne cesse de délivrer ses vertus.

Dans ce contexte, le raisin *Vitis vinifera* et ces dérivés sont très utilisés dans le domaine alimentaire, cosmétique et pharmacologique pour sa composition riche en polyphénols et en flavonoïdes ayant des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antivirales...

Dans ce présent travail nous nous intéressons à la variété sultanine du *Vitis vinifera*, pour laquelle nous testons son extrait acétonique sur quelques fonctions du neutrophile humain. Comme pour toute molécule destinée à la santé, il est impératif de tester son innocuité sur les cellules humaines. D'où nos objectifs qui se résument en deux points principaux :

- Une caractérisation de notre extrait acétonique de *Vitis vinifera*.
- Une évaluation *in vitro*, de l'effet de l'extrait acétonique de *Vitis vinifera* sur la viabilité, l'adhérence et la dégranulation des neutrophiles humains isolés à partir du sang frais.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I
Les polynucléaires
neutrophiles

1.1. Description des neutrophiles

Décrit pour la première fois par Paul Ehrlich au tournant des années 1900 (WITKO- SARSAT *et al.*, 2000), les polynucléaires neutrophiles (PN) sont de véritables phagocytes professionnels, caractérisés par un noyau polylobé et un cytoplasme riches en granulations (BORREGAARD et COWLAND, 1997). Ils représentent la population la plus abondante des leucocytes circulants (70%) et constituent près de 95% des granulocytes (ABBAS *et al.*, 2012).

Un individu adulte peut produire environ 10^{11} de PNs par jour qui circulent dans le sang durant seulement 6 heures sous forme d'une cellule mature sphérique de 12 à 15 μM de diamètre (GALLI *et al.*, 2011). Les neutrophiles ont une demi-vie allant de 6 à 10 heures s'ils ne sont pas recrutés au site infectieux. En réponse aux stimuli inflammatoires, les PNs sont les premières cellules à quitter la circulation sanguine et migrent dans les tissus périphériques pour gagner le site inflammatoire afin de débarrasser l'organisme des agents microbiens (CARUSO *et al.*, 2012). Ils ne re-circulent plus après leur sortie des vaisseaux sanguins, dans ce cas, ils peuvent survivre jusqu'à quelques jours afin d'accomplir leur fonctions inflammatoires (MARTIN *et al.*, 2003).

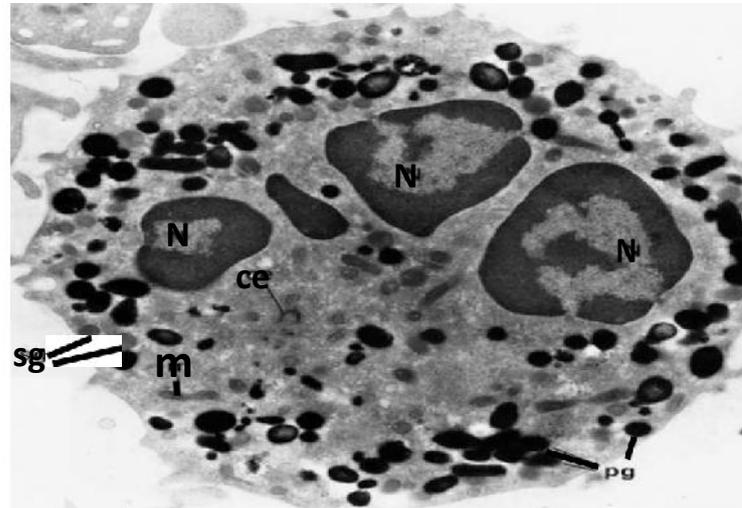


Figure 1. Morphologie d'un neutrophile observé sous microscopie électronique.pg : granule primaire, sg : granule secondaire, N : noyau, Ce : centriole, m : mitochondrie (D'après WITKO- SARSAT *et al.*, 2000).

1.1.1. Source et maturation

1.1.1.1. Source des neutrophiles

La différenciation des polynucléaires neutrophiles ou granulopoïèse intervient dans la moelle osseuse sur une période de 10 à 14 jours. Elle débute à partir d'une cellule souche hématopoïétique (**CSH**) qui se différencie en un progéniteur multipotent (**PM**) qui lui-même donnera soit les progéniteurs lymphoïdes communs (**PLCs**) soit les progéniteurs myéloïdes communs (**PMCs**). Les **PMCs** ont la capacité de se développer en progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes (**PMEs**), et en progéniteurs granulocytes-macrophages (**PGMs**). Ces derniers vont poursuivre leur différenciation en passant successivement par les stades myéloblaste, promyélocyte, myélocyte puis métamyélocyte avant de donner les polynucléaires neutrophiles matures (BORREGAARD, 2003) (Figure 2).

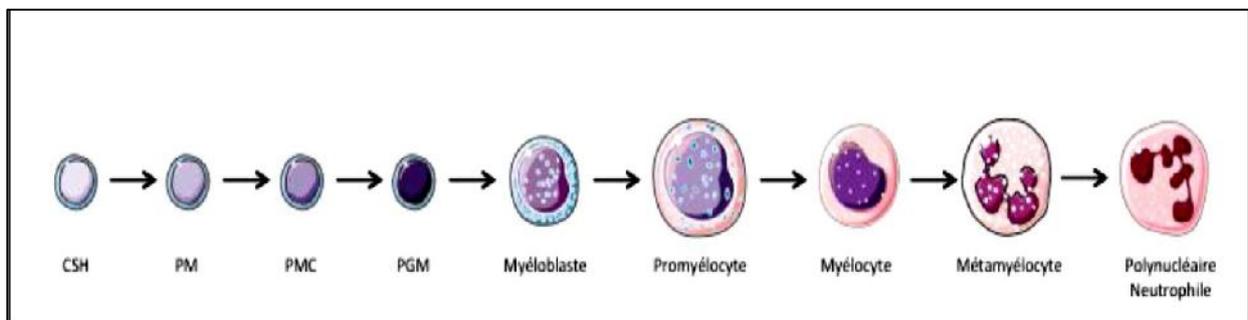


Figure 2. Différenciation des polynucléaires neutrophiles (D'après ROSENBAUER et TENEN, 2007).

1.1.1.2. Maturation des neutrophiles

Les granulations caractéristiques de la lignée granuleuse apparaissent successivement au cours de la maturation du précurseur granulocytaire, à partir du stade myéloblaste. Elles sont d'une grande hétérogénéité et classées en fonction de leur chronologie d'apparition. Classiquement, on distingue quatre type de granules dont les caractéristiques sont reprises dans le tableau I (SEGAL, 2005 ; BORREGAARD, 2007).

Tableau I. Les différents types de granules présents chez le polynucléaire neutrophile

Le type de granules	Caractéristiques	Références
Les granules primaires ou azurophiles	<p>-apparaissent en premiers au stade promyélocyte et de grande taille (0.3 μm de diamètre) ;</p> <p>-contiennent des hydrolases acides, des protéases neutres et des substances bactéricides (myéloperoxydase MPO), et dans la réaction inflammatoires (élastine et divers enzymes lysosomiales) ;</p> <p>-jouent un rôle majeur dans la réaction Inflammatoire.</p>	<p>- NUSSE et LINDAU, 1988.</p> <p>-GULLBERG <i>et al.</i>, 1999.</p> <p>-LACY, 2005.</p>
Les granules secondaires ou spécifiques	<p>-formées au stade de la maturation des myélocytes et de taille moyenne (0.2 μm de diamètre) ;</p> <p>-identifiées par leur contenu en phosphatase alcaline et en lactoferrine et l'absence de la MPO ;</p> <p>-comportent des molécules essentielles aux fonctions de neutrophile telles que les α-2-intégrines (CD11b/CD18) et le cytochrome b558, le constituant membranaire du système NADPH Oxydase ;</p> <p>- contiennent une collagénase, permet la migration des PN vers le site inflammatoire.</p>	<p>-DESCAMPS-LATSCHA et WITKO-SARSAT, 1999.</p> <p>-FAURSCHOU et BORREGAARD, 2003.</p> <p>-WITKO-SARSAT, 2012.</p>
Les granules tertiaires	<p>- formées dans les métamyélocytes ;</p> <p>-contiennent une gélatinase et des molécules d'adhésion des neutrophiles.</p>	<p>-MOLLINEDO <i>et al.</i>, 1993.</p> <p>-FAURSCHAU et BORREGAARD, 2003</p>
Les vésicules sécrétoires	<p>-créées par le processus d'endocytose et apparaissent plus tardivement à la fin de la maturation du neutrophile ;</p> <p>-constituent un réservoir de récepteurs membranaires et de molécules d'adhérence tels que α-2-intégrines, le récepteur de fMLP et celui de lipopolysaccharid (LPS).</p>	<p>-GOUGEROT-POCIDALO et HALBWACHS-MECARELLI, 2005.</p> <p>-BORREGAARD <i>et al.</i>, 2007.</p>

1.2. Les propriétés des neutrophiles

Le recrutement des PN dans la circulation sanguine vers le foyer infectieux est un processus fondamental dans la réaction inflammatoire, il se déroule grâce à la capacité d'adhérence, de chimiotactisme, de diapédèse de ces cellules immunitaires.

1.2.1. Adhérence

Elle se déroule en plusieurs étapes dictées par l'expression séquentielles de molécules d'adhésion aussi bien sur les neutrophiles que sur les cellules endothéliales de la paroi vasculaire. L'initiation de la migration du PN commence avec son adhésion réversible à l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire des sélectines (L-sélectines, P-sélectines et E-sélectines) (GOUGEROT-POCIDALO et HALBWACHS-MECARELLI, 2005). De telle sorte à ce qu'il paraisse entrain de rouler le long de la paroi vasculaire, d'où le nom rolling, ce dernier s'achève par une adhésion ferme (WAGNER et ROTH, 2000) caractérisée par la disparition rapide des L-sélectines de la surface du PN. Parallèlement, l'expression et l'affinité des 2 intégrines leucocytaires, vont être augmentées (GOUGEROT-POCIDALO *et al.*, 2006 ; GABORSKI *et al.*, 2008). Cette adhésion ferme est une étape cruciale et nécessaire à la transmigration dans l'espace extravasculaire vers l'agent infectieux.

1.2.2. Diapédèse

De nombreux facteurs solubles provenant du site infectieux tels que la thrombine, la bradykinine, l'histamine, les facteurs de croissance, l'IL-8 et le TNF- α , Ils agissent à la fois sur les PN et l'endothélium. Ils sont connus par leur capacité d'augmenter la perméabilité vasculaire et d'activer séquentiellement l'expression des molécules d'adhérence et leurs ligands. En effet, Ces facteurs se lient à leurs récepteurs membranaires endothéliaux et provoquent la contraction de ces cellules (MEHTA et MALIK, 2006). Le neutrophile change sa forme sphérique en s'aplatissant contre les cellules endothéliales et en émettant un pseudopode dans la jonction des cellules endothéliales. Ceci est suivi par le glissement du PN entre les cellules endothéliales, c'est la diapédèse (TÖZEREN et LEY, 1992). Le contact endothélium-neutrophile, durant la diapédèse, fait intervenir des interactions entre un même type de molécules PECAM-1 et CD99 qui sont exprimées, à la fois, sur la jonction endothéliale et les PN stimulés (GUO et WARD, 2002 ; DISTASI et LEY, 2009).

1.2.3. Chimiotactisme

Le PN est attiré par des substances chimio-attractantes provenant du site inflammatoire. Les principales substances sont les peptides N-formylés dérivés des protéines bactériennes, certaines fractions du complément tel que C5a, le leucotriène B4 (LTB₄), le « facteur d'activation des plaquettes » (PAF) ou encore l'interleukine 8 (IL8). Les substances chimiotactiques se lient à la surface des PN par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques à sept domaines transmembranaires, couplés à une protéine G, qui est responsable de la transduction du signal.

Ces récepteurs aux chimio-attractants permettent au PN de se déplacer et de s'orienter vers le foyer inflammatoire, dans le sens du gradient des stimuli et se concentrent au niveau du front de migration lors de la diapédèse. Le PN secrète des protéases dont les métalloprotéases (MMP-9), qui digèrent la matrice et démasquent des sites d'adhérence reconnus spécifiquement par les 2 intégrines du PN (Figure 3) (GOUGEROT-POCIDALO, 2002).

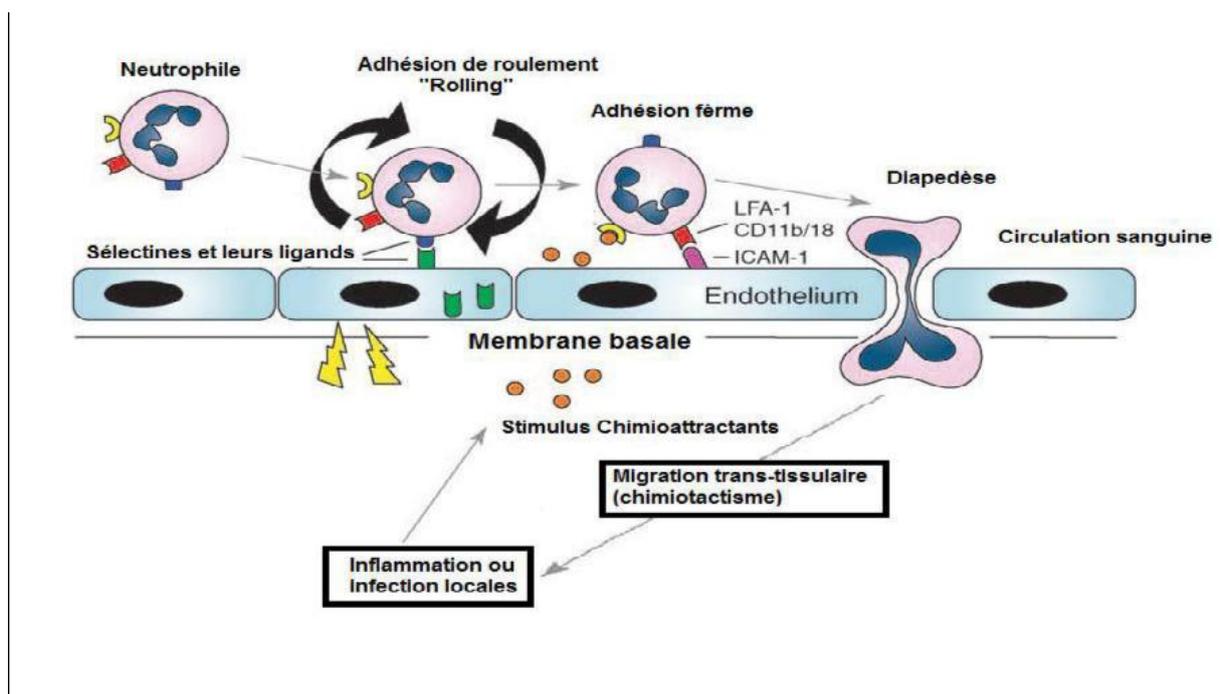


Figure 3. Etapes de la migration des neutrophiles activés à travers la paroi endothéliale vasculaire (D'après GUO et WARD, 2002 ; THEILGAARD-MÖNCH *et al.*, 2006).

1.3. Les fonctions des neutrophiles

Les neutrophiles exhibent des fonctions anti-infectieuses par lesquelles ils empêchent la croissance et la propagation des microbes pathogènes. Leur capacité est étroitement liée aux nombreuses activités spécifiques telles que la phagocytose, la bactéricidie, ...etc.

1.3.1. La phagocytose

Après avoir quitté la circulation sanguine et traversé le tissu interstitiel, le neutrophile arrive au niveau du site inflammatoire où se situe sa cible finale qu'il doit éliminer par phagocytose qui se déroule en trois étapes :

- La reconnaissance et l'adhérence du neutrophile au pathogène qui s'effectuent via des récepteurs présents à la surface du PN comme les TLRs (Toll Like Receptor), fragment Fc des immunoglobulines (Fc IIRA) et les récepteurs des éléments du complément (CR3) (WITKO-SARSART *et al.*, 2000).
- Une fois le contact établi, un remodelage du cytosquelette du PN génère la force et les structures nécessaires à l'invagination de la membrane du neutrophile afin d'internaliser le pathogène dans le phagosome (SARANTIS et GRINSTEIN, 2012).
- Après l'internalisation, le pathogène se retrouve dans un environnement hautement toxique grâce à la libération du contenu microbicide et protéolytique des granules cytoplasmiques (NAUSEEF, 2007 ; KANTARI *et al.*, 2008).

1.3.2. La bactéricidie

Les neutrophiles éliminent les micro-organismes pathogènes par deux mécanismes comme, la dégranulation et la production de FRO par la NADPH oxydase. Ces deux mécanismes ont lieu simultanément.

1.3.2.1. Dégranulation

La dégranulation est l'une des principales fonctions du neutrophile, par laquelle les contenus granulaires sont libérés après la fusion des différents granules sécrétoires avec la membrane du phagosome. La mobilisation hiérarchique et l'exocytose de divers granules du PN, suite à la stimulation par le fMLP qui se fixe sur son récepteur de surface le formyl peptide receptors (FPRs), sont liées à un certain seuil du Ca^{2+} intracellulaire (FAURSCHOU et BORREGAARD, 2003). Ces ions à un taux suffisant interviennent dans la réorganisation d'actine (LIGETI et MÓCSAI, 1999 ; LACY, 2005).

1.3.2.2. Formation d'anion superoxyde

Pendant la réaction inflammatoire, les PN synthétisent de FRO afin de détruire le pathogène phagocyté. La production des FRO est initiée par l'activation du complexe NADPH oxydase qui génère l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, dans le processus de l'explosion oxydative (MASSENET *et al.*, 2005).

Suite à la stimulation du PN, le système NADPH oxydase devient actif après l'assemblage de ces composés cytosoliques avec ceux membranaires (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000 ; DANG *et al.*, 2011). La dismutation du $O_2^{\bullet-}$ donne naissance au superoxyde d'hydrogène qui favorise la production d'une variété des substances hautement réactives (Figure 4) telles que le $\bullet OH$ et le HOCl (MURPHY et DECOURSEY, 2006). Toutefois, la surproduction des FRO peut endommager les cellules et les composants tissulaires ce qui peut entraine des maladies inflammatoires graves.

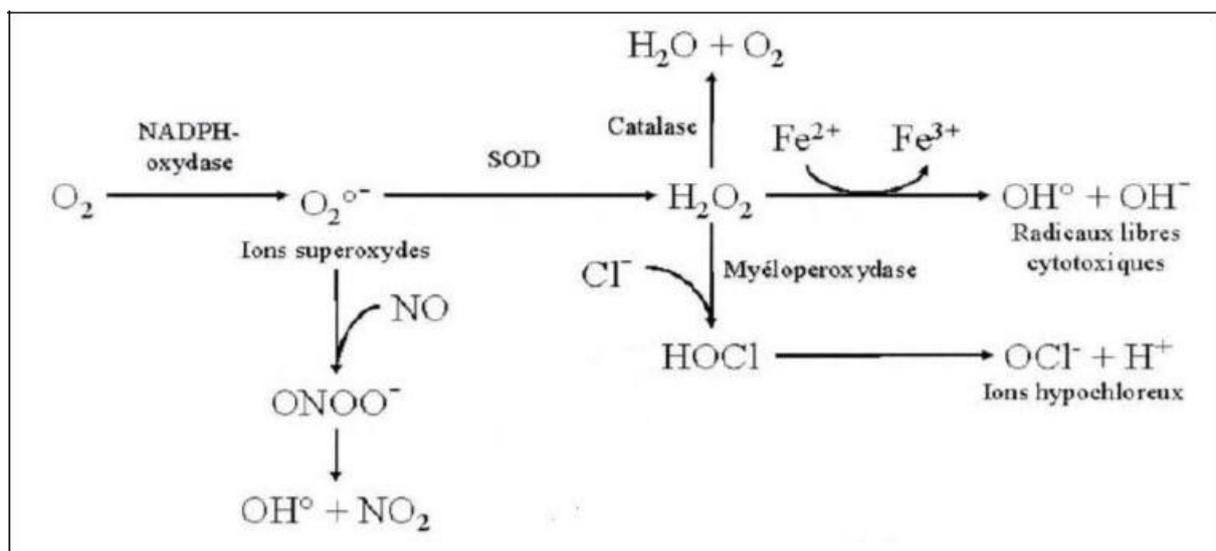


Figure 4. Métabolismes des Formes réactives de l'oxygène (D'après DELBOSC *et al.*, 2001).

1.3.2.3. La bactéricidie médié par les filets extracellulaires

Après l'étape complexe de transmigration, les PN migrent dans les tissus vers le site inflammatoire. L'activation des PN induit la synthèse et la libération de substances protéolytiques, responsable le plus souvent de leur mort cellulaire par nécrose, caractérisée par une perte de l'intégrité membranaire et par la libération du contenu des granulations du PN dans l'environnement tissulaire. La nécrose des PN stimule la réaction inflammatoire locale (MIYAKE et YAMASAKI, 2012 ; GREENLEE-WACKER, *et al.*, 2014), qui peut être contrôlée par l'apoptose de PN suivie de leur phagocytose par les macrophages résidents, cette

activité antimicrobienne des neutrophiles qui consiste à émettre un maillage fait de fibres de chromatine entourées de protéines antimicrobiennes dérivées de leurs granules comme la MPO ou les cathépsine G. Ces structures appelées NETs (Neutrophil Extracellular Traps) seraient une stratégie de défense post-mortem déployée par le neutrophile (KAPLAN et RADIC, 2012). La formation des NET est régulée par la production de FRO induite par la NADPH oxydase (REMIJSEN *et al.*, 2011). Contrairement à l'apoptose, la formation des NET est dite indépendante des caspases (Figure 5).

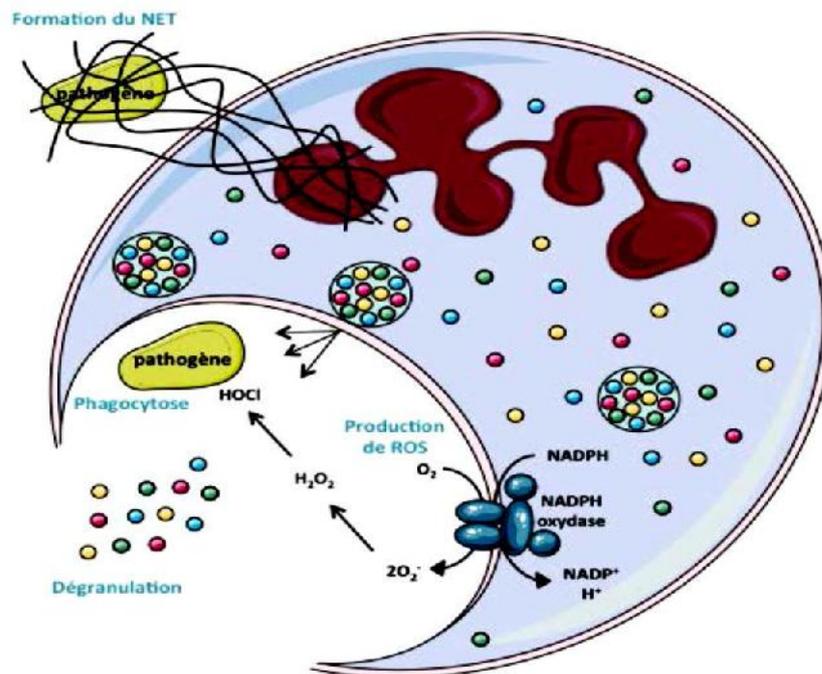


Figure 5. Arsenal antimicrobien des neutrophiles (D'après FOURNIER et PARKOS, 2012).

1.4- Régulation des fonctions des neutrophiles

L'apoptose du neutrophile est un point critique pour la réussite de la résolution de l'inflammation. Elle est hautement régulée par un processus qui fait intervenir des facteurs de mort cellulaire comme le ligand de Fas (FasL), le TNF^- , les caspases, la famille des Bcl-2 (B-cell leukemia protein-2), les FRO, les calpains ainsi que le pathogène. Lorsque les neutrophiles entrent en apoptose, leurs fonctions sont négativement régulées. Ils perdent notamment leur capacité à synthétiser les chimiokines, à répondre aux peptides chimio-attractants, à phagocyter ainsi qu'à entreprendre l'explosion oxydative et la dégranulation.

La balance entre la mort et la survie des neutrophiles doit être donc finement régulée vue qu'une prolongation de la durée de vie des neutrophiles ou une augmentation de leur mort est impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires et immunitaires (OTTONELLO *et al.*, 2002).

1.5. Dysfonctionnement des neutrophiles

Des défaillances majeures des fonctions primaires des polynucléaires neutrophiles entraînent la plupart du temps des infections répétées et/ou graves, systémiques, parfois mortelles (GALLIN, 1985), ils peuvent causer des dommages aux tissus sains lors d'une activation prolongée, d'une accumulation exagérée et non nécessaire (WEIS, 1989), d'une suractivation ou d'un dérèglement qui retourne l'attaque contre l'organisme, comme dans l'ischémie (ENTMAN *et al.*, 1992), la goutte (GAUDRY *et al.*, 1993), l'arthrite rhumatoïde (FIRESTEIN, 1992) et d'autres maladies inflammatoires aiguës ou chroniques (GOUGEROT-POCIDALO *et al.*, 2002).

Chapitre II
Vitis vinifera

2.1. La description de la vigne et du raisin**2.1.1 La vigne**

La vigne est une plante sarmenteuse, vivace, appartient à la famille des *Vitacées* ou *Ampélidacées* dont les plantes ligneuses. Les plantes de cette famille sont des lianes à tige plus ou moins sarmenteuse, mais parfois herbacée (REYNIER, 2007). Elle est des phanérogames (végétaux ayant des fleurs), et appartient aux angiospermes (ovules toujours cachés dans un ovaire) de la classe de dicotylédones.

Vitis vinifera est l'espèce viticole la plus commune et la plus importante au niveau économique. (GALET, 1993). C'est la principale espèce de vignes cultivée en Europe, l'ouest de l'Asie et le nord de l'Afrique. Elle est cultivée pour ses fruits en grappes et à l'origine de très nombreux cépages (cabernet, merlot, pinot, sauvignon, etc., ...) (GALET, 2000).

2.1.2. Le raisin

Le raisin est une baie, classée dans le groupe des fruits charnus à pépins. La grappe de raisin est constituée de deux parties bien distinctes : la rafle, qui en est la charpente, et le fruit proprement dit, le grain ou baie de raisin. Cette dernière se compose elle-même de trois constituants : la pellicule, la pulpe et les pépins. En général, la rafle représente en poids 3 à 6% de la grappe mûre, la baie en constitue 94 à 97%. La pulpe constitue 75 à 85% du poids des baies, les pellicules 15 à 20%, les pépins 3 à 6% (Figure 6) (CABANIS *et al.*, 1998).

Quant aux variétés sans pépins, également appelées apyrènes, utilisables pour la production de raisins de table et les raisins secs. La variété la plus connue et la plus cultivée dans le monde est la Sultanine blanche, également appelée Thompson seedless, les variétés de ce type ne sont pas des variétés sans pépins au sens strict, comme le sont par exemple les variétés de Corinthe noir, qui possèdent des ébauches de pépins rudimentaires, de taille très réduite (STOUT, 1936).



Figure 6. Photo d'une grappe de raisin sultanine.

2.2. Composition biochimique du raisin *Vitis vinifera*

Tableau II. Composition biochimique du raisin. Les quantités exprimées en pourcentage de poids frais présenté dans le tableau ci-dessous (CABANIS *et al* 1998)

Composés biochimiques	Rafles	Pellicules	Pépins	Pulpe
Eau	78-80	78-80	25-45	70-85
Glucides	0.5-1.5	-	34-36	14-25
Acides organiques	0.5-1.6	0.8-1.6	-	0.9-2.7
Anthocyanes	-	0-0.5	-	-
Tanins	2-7	0.4-3	4-10	< 0.05
Composés azotés	1-1.5	1.5-2	4-6.5	0.6-0.7
Minéraux	2-2.5	1.5-2	2-4	<0.3
Lipides	-	-	13-20	-

2.2.1. Quelques composés antioxydants du raisin

2.2.1. 1. Les polyphénols

Dans la nature, plus de cent mille composés sont présents et près de deux cents sont connus dans le raisin, les composés phénoliques proviennent principalement de la pellicule et des pépins de la baie du raisin (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1998). Caractérisés par la présence

d'au moins d'un noyau benzénique (Figure 7) auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (BRUNETON, 1999, LUGASI *et al.*, 2003).

2.2.1.2. Les Flavonoïdes

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (SEYOUM *et al.*, 2006). Ils sont considérés comme les pigments quasi universels des végétaux, Presque toujours hydrosolubles, ils sont, entre autres et pour certains, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (JACQUES MACHEIX *et al.*, 2005). Tous les flavonoïdes possèdent le même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (BRUNETON, 1999) (figure 7).

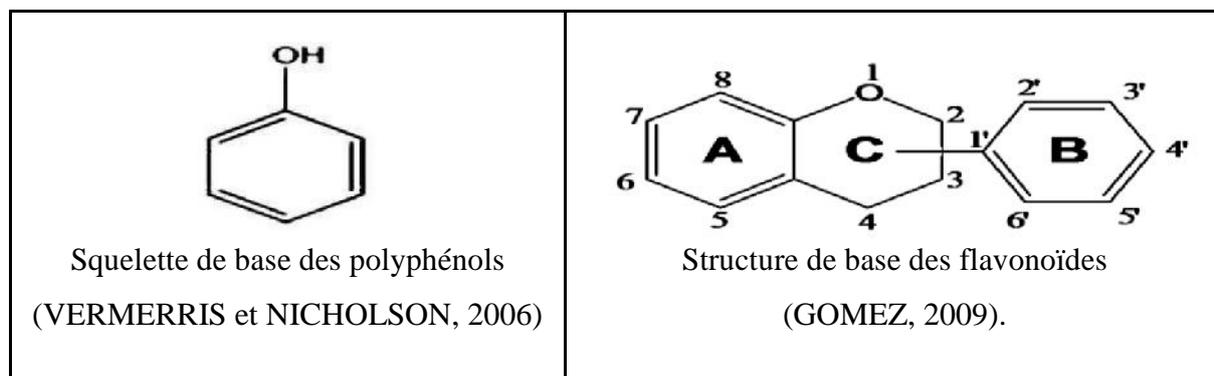


Figure 7. La structure chimique des polyphénols.

2.3. Bienfaits des polyphénols du raisin *Vitis vinifera*

Les raisins sont parmi les fruits riches en polyphénols, avec approximativement 75% de polyphénols du raisin existant dans les graines et la peau.

La consommation de raisin ou de ces produits dérivés contenant des polyphénols peut conduire à une diminution de l'agrégation plaquettaire ainsi qu'à des effets vasodilatateurs des vaisseaux sanguins. Les polyphénols de raisin jouent un rôle préventif sur certaines pathologies tels que l'athérosclérose, le diabète ou l'hypertension par le piégeage direct des radicaux libres. Ils ont la capacité à économiser les antioxydants endogènes (vitamine E, vitamine C) et des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) ainsi qu'un effet de chélation des cofacteurs d'oxydation des acides gras comme certains métaux (Fe^{2+} , Cu^{2+}) et un effet inhibiteur dans la genèse de production de la NAPH oxydase au niveau des cellules de la paroi

vasculaire, d'où une diminution de la production de radicaux libres (CHIRA *et al.*, 2008). Comme les autres fruits, Les raisins secs issus de la sultanine sont concentrés en glucides, environ la moitié de leurs glucides disponibles est le fructose et le glucose (MATTHEWS *et al.*, 1987 ; YEONSOO *et al.*, 2008 ; GARY et ARIANNA, 2010).

Ces glucides passent facilement dans le sang sans digestion. Ceci a un intérêt nutritionnel, en particulier pour les bébés, les enfants, les sportifs et dans certaines situations exigeant une énergie immédiate. Ainsi, ils sont nécessaires pour le système nerveux central, les reins, le cerveau, les muscles (y compris le cœur) pour fonctionner (SRILAKSHMI, 2006).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Matériel et méthodes

1-Matériel et Méthodes

Le stage pratique a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de Biochimie au sein de l'université de Mouloud Mammeri à Tizi-Ouzou.

1-1-Matériel

Tableau III. Matériel utilisés au laboratoire

Appareils	<ul style="list-style-type: none"> -agitateur magnétique ; -balance de précision analytique (DENVER) ; -bain marie (MAMMERT) ; -microscope photonique (hund-WETZLAR) ; -microscope inverse (hund-WETZLAR) ; -hotte à flux laminaire (BIOBASE) ; -centrifugeuse (SIGMA) ; -mini-centrifugeuse (centrifugeuse de paillasse) ; Etuve (MAMMERT) ; -plaque chauffante (LABINCO) ; -pH mètre ; Vortex.
Produits chimiques	<ul style="list-style-type: none"> -dextran T500 (2%); -KH_2PO_4 ; KCl ; NaCl ; $\text{Na}_2\text{HPO}_2(\text{H}_2\text{O})$; -NaOH (1N) ; Ficoll ; -colorants : bleu de trypan, cristal violet ; -ethanol ; NaCl (0.2% ,1.8%). -fMLP ; Cytochalasine B ; PBS ; - acide Gallique ; Folin (10%) ; -BSA ; solution C ; Carbonate de sodium (4%) ; Quercétine ; Acétate de potassium.
Matériels biologiques	<ul style="list-style-type: none"> -du sang frais humain récolté à partir de donneurs sains sur un Anticoagulant (EDTA) ; -un extrait de raisin : préparé par madame BOUBCHIR-LADJ suite à des étapes d'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols à partir d'une matrice végétale : <i>Vitis-vinifera</i>, variété «sultanine »

1.2. Méthodes

1.2.1. Isolement des neutrophiles

Avant l'isolement des PN nous avons réalisé un frottis du sang total sur une lame en verre en utilisant le cristal violet (colorant à base de violet de Gentiane et d'acide acétique) afin de visualiser les différents éléments figurés du sang sous microscope photonique.

Le but de la méthode du Dextran- Ficoll décrite dans la figure 8 est de séparer les PN des autres cellules sanguines à partir d'un sang frais prélevé dans des tubes EDTA. Le principe de cette séparation est basé sur le phénomène de sédimentation par gradient de densité.

L'isolement des PN commence par un mélange d'un volume du sang à un volume de Dextran-T500 à 2% dans un tube Falcon. Après 30 min d'incubation à température ambiante, on obtient un culot qui renferme la majorité des érythrocytes précipités au fond du tube et un surnageant contenant les globules blancs, ce dernier est récupéré dans un tube Falcon et centrifugé à 400g pendant 8 min à 22°C.

Le culot est resuspendu dans 2/3 de tampon phosphate à pH 7.3 , puis déposé sur un coussin de Ficoll et centrifuge pendant 30 min à 400g à 22°C. Après cette étape, on distingue trois phases : un culot contenant les PN et érythrocytes contaminants, un anneau gris entre le culot et le surnageant contenant les lymphocytes et les monocytes et un surnageant formé de plasma, PBS et Ficoll.

L'élimination des érythrocytes résiduels est réalisée par l'ajout d'une solution hypotonique froide de NaCl à 0.2% au culot, en mélangeant pendant 40 secondes, suivie de l'ajout d'un même volume de NaCl 1.8% afin de rétablir l'isotonicité. La solution est tamponnée par ajout de PBS froid. Les PN sont récupérées après une centrifugation à 400g pendant 8 min à 4°C dans un volume de 1 ml de PBS (annexe 1) puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

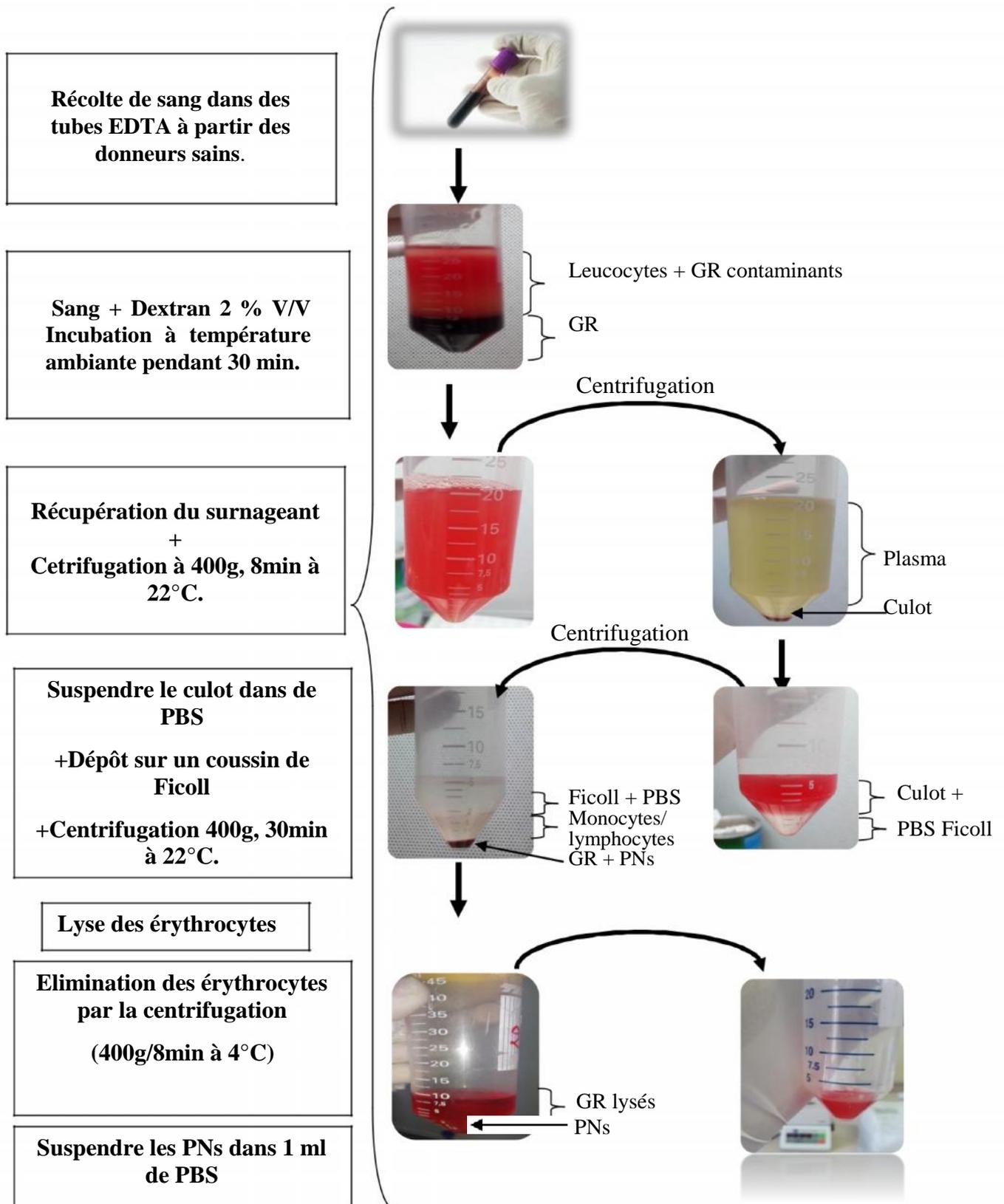


Figure 8. Diagramme représentant les étapes de purification des neutrophiles.

GR : globules rouges ; PNs : polynucléaires neutrophiles

1.2.2. Dénombrement des Neutrophiles

Le dénombrement des PN s'effectue par la dilution de 10 μ l de PN dans 90 μ l de cristal violet (1/10). On dépose 15 μ l de ce mélange sur une cellule de MALASSEZ dans le but de faire le comptage des PN sous microscope photonique.

Le dénombrement se fait en comptant les cellules avec un noyau polylobé colore grâce au cristal violet, en allant de gauche à droite (figure 9). Le comptage s'effectuera le long de trois lignes pour obtenir une moyenne, et on applique la formule suivante :

$$N = n \times 10 \times F \times 1000 \text{ml} \times Vt$$

N = nombre des PN.

n = moyenne des trois lignes.

F = facteur de dilution.

Vt = volume total des PN.

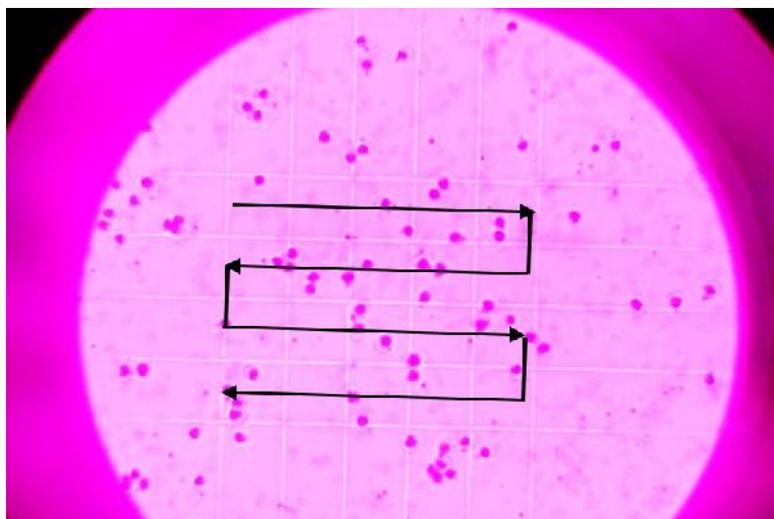


Figure 9. Comptage des PN avec une cellule de MALASSEZ observé sous microscope photonique au grossissement X 40.

2. Caractérisation de l'extrait de *Vitis vinifera*

L'extrait acétonique de *Vitis vinifera* a été solubilisé dans le l'eau distillée en vue de sa caractérisation.

2.1. Dosage des polyphénols présent dans l'extrait *Vitis vinifera*

Ce dosage a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi pour la détermination de la concentration des polyphénols totaux présents dans l'extrait de raisin *Vitis vinifera*, il a été réalisé par la méthode de COSTA *et al.* (2016) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Le principe du dosage est basé sur la réduction des produits alcalins comme l'acides phosphomolybdique et tungstique par les composés phénoliques lors de la réaction.

Les polyphénols oxydés engendrent une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à leur concentration. La densité optique a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 750 nm. L'acide gallique (Annexe 5) a été utilisé comme référence pour établir une gamme d'étalonnage.

Le dosage consiste à mélanger 500 µl d'extrait de *Vitis vinifera* (10mg/ml), avec 2.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 2 ml de carbonate de sodium (4%), pour avoir à la fin un volume total de 5 ml. Le tout est incubé à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante avant de mesurer par spectrophotométrie. L'absorbance est mesurée à 750 nm. La concentration de polyphénol est exprimée en équivalent d'acide gallique (EqGA), sachant que la gamme de concentration d'acide gallique est comprise entre 0 et 80 µg/ml, la courbe d'étalonnage est représentée dans l'annexe 7.

2.2. Dosage des flavonoïdes présents dans l'extrait de *Vitis vinifera*

La concentration des flavonoïdes dans l'extrait de *Vitis vinifera* a été déterminée selon la méthode de COSTA *et al.*, 2016, qui est une méthode colorimétrique par l'utilisation de chlorure d'aluminium et d'acétate de potassium comme réactifs (CHANG *et al.*, 2002) qui consiste à faire une analyse au spectrophotomètre à 425 nm. La quercétine a été utilisée comme standard.

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium ou l'acétate de potassium. Oxydés, les flavonoïdes (Annexe 6) engendrent une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à leur concentration. La densité optique a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 425 nm. La quercétine a été utilisée comme référence pour établir une gamme d'étalonnage.

La réaction consiste à mélanger 500 µl d'extrait de *Vitis vinifera* (10mg/ml), avec 0.1 ml d'acétate de potassium, 1.5 ml d'éthanol et complété avec de l'eau distillé, pour avoir à la fin un volume total de 5 ml. Le tout est incubé à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante avant de mesurer par spectrophotométrie. L'absorbance est mesurée à 425 nm. La concentration des flavonoïdes est exprimée en équivalent de quercétine, sachant que la gamme des concentrations de quercétine est comprise entre 0 et 50 µg/ml. La courbe d'étalonnage est représentée dans l'annexe 8.

2.3. Dosage des sucres réducteurs présents dans l'extrait de *Vitis vinifera*

La concentration des sucres présents dans l'extrait de *Vitis vinifera* a été déterminée avec la méthode de l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS). En milieu alcalin et à chaud l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique en présence du glucose et du fructose considéré comme des sucres réducteurs. Le composé obtenu est rouge orangé à reflets pourpres. La densité optique a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 530 nm. Deux gammes d'étalonnages ont été réalisés en utilisant des concentrations connues en glucose et fructose [0 ; 0.2 ; 0.4 ; 0.6 ; 0.8 ; 1] g/l (annexe 9).

La réaction consiste à mélanger 1ml de l'échantillon à doser avec 2 ml du réactif 3,5 DNS puis chauffer au bain marie pendant 5 minutes. Après refroidissement et l'ajout 7ml d'eau distillée, on laisse le mélange reposer à température ambiante pendant 15 minutes, on termine par la mesure de la densité optique à 530 nm contre le blanc. (Annexe 3)

3. Evaluation de l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la viabilité des neutrophiles

L'utilisation de nouvelles molécules chez l'homme, exige d'abord de vérifier leurs innocuités pour éviter toutes complications sur la santé humaine. Afin de déterminer un éventuel effet cytotoxique de l'extrait acétonique de *Vitis vinifera* sur les PNs humain, nous avons préparé une série de dilutions de [0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200] µg/ml. Les cellules traitées avec différentes concentrations de l'extrait sont incubées pendant 60 minutes à 37°C.

Afin de nous affranchir des erreurs dues à la présence des traces d'acétone dans l'extrait, nous avons prévu un contrôle à 0.01% d'acétone ou les PNs ont été traités avec de l'acétone seul et dans les mêmes conditions expérimentales. L'évaluation de l'effet cytotoxique est effectuée par microscopie photonique en dénombrant les cellules mortes colorées au bleu de trypan se trouvant dans un champ de 100 cellules.

4. Evaluation de l'effet de l'extrait *Vitis vinifera* sur l'adhérence des neutrophiles

Pour mettre en évidence l'effet de l'extrait du raisin *Vitis vinifera* sur l'adhérence des PNs, les mêmes procédures de dilution que le test de viabilité ont été suivies, puis incubées pendant une heure à 37°C dans une étuve. Après incubation, les solutions sont déposées dans des boîtes de Pétri en polypropylène moins collantes pour les cellules de 3.5 cm de diamètre (Figure 10). Ces boîtes sont incubées pendant 15 minutes à 37°C dans une étuve. Une fois l'incubation terminée, le surnageant est récupéré afin d'évaluer l'effet de *Vitis vinifera* sur l'adhérence en dénombrant les cellules non adhérentes par coloration au cristal violet sous microscope photonique, tout en observant les cellules adhérentes avec le même colorant sous microscope inversé. Un contrôle à l'acétone est également réalisé dans les mêmes conditions du test d'adhérence.

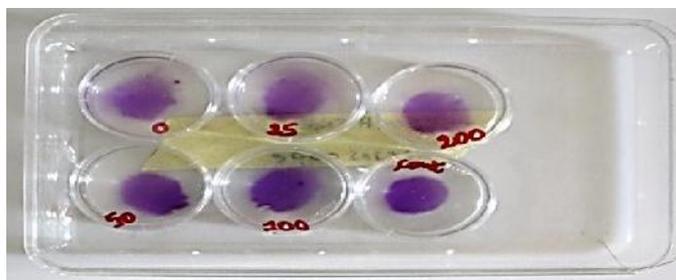


Figure 10. Boîtes de Petri contenant les différentes dilutions colorées au cristal violet.

5. Evaluation de l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la dégranulation des neutrophiles

5.1. Induction de la dégranulation des neutrophiles

La dégranulation des PNs peut être induite par des agents solubles comme le phorbol myristate acétate (PMA) et le fMLP qui mobilise des récepteurs de surface les FPRs auxquels se lie et active la protéine G trimérique. Quant au PMA, il induit l'activation directe de la protéine Kinase C. La réponse PMA est caractérisée par une phase de latence comparée à celle du fMLP.

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la dégranulation des neutrophiles, nous avons stimulées ces cellules à sécréter leur contenu protéique. La dégranulation des

neutrophiles peut être induite dans les conditions *in vitro*, en les incubant dans un bain marie à 37°C en présence de la cytochalasine B (5µg/ml) pendant 5min avant de les stimuler avec le fMLP (10^{-6} M) pendant 2 minutes, la réaction est arrêtée en centrifugeant les cellules.

Pour tester l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la dégranulation des PNs, ces derniers sont pré-incubés en présence ou en absence de l'extrait pendant 15 min à 37°C avant d'induire la dégranulation.

Trois contrôles ont été réalisés : un contrôle négatif correspond aux cellules au repos contenant uniquement la cytochalasine B, un contrôle positif correspond aux cellules traitées avec la cytochalasine B et stimulées au le fMLP et un contrôle contenant de l'acétone, du fMLP et de la cytochalasine B.

La réaction de dégranulation est arrêtée par centrifugation des neutrophiles à 10000g pendant 30 secondes à 4°C, le surnageant récupéré est congelé à -20°C pour analyse. La quantité de protéines dans le surnageant a été évalué ainsi que l'activité de la MPO, les protocoles des dosages sont décrits ci-dessous.

5.2. Dosage des protéines sécrétoires des neutrophiles

La quantification du contenu libéré par les neutrophiles lors de la dégranulation est réalisé par la méthode de Lowry *et al.*, 1951 qui repose sur le principe d'une réaction entre le réactif de Folin-Ciocalteu et certains acides aminés tels que la tyrosine (Tyr), le tryptophane (Trp), la cystéine (Cys) et histidine (His) qui donne naissance à un complexe coloré le bleu de molybdène dont l'intensité peut être mesurée au spectrophotomètre à 750 nm.

Le dosage se fait à travers une gamme étalon, réalisée à l'aide de quantités connues de l'albumine de sérum bovin (BSA). La sensibilité du dosage est augmentée par un prétraitement préalable de la réaction par un réactif au cuivre en milieu basique par la solution C contenant 50ml de la solution A (Na_2CO_3 anhydre 2% dans NaOH, 0.1 M) et 1 ml de la solution B (2 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5% + 2 ml de tartrate de Na et K, 1 %).

La mesure de la densité du contenu protéique libéré par les neutrophiles lors de la dégranulation est réalisée par ajout de 5 ml de la solution C et laisser à température ambiante. Ajouter, ensuite 0.5ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Homogénéiser bien et mettre les tubes à l'obscurité pendant 30min. Après 30min, on passe au spectrophotomètre et lire la DO à 750 nm (annexe 10).

5.3. Evaluation de l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur l'activité de la myéloperoxydase

Pour évaluer l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur l'activité de la MPO sécrété par les PN suite à leur stimulation par le fMLP, nous avons mélangé 50µl de surnageant issu de la dégranulation avec 50µl d'Orthodianizidine (2 mg/2 ml) et de 50µl de H₂O₂ (0.003%), compléter avec 350µl PBS. La lecture des densités optiques a été faite par spectrophotometrie à 460nm.

Résultats et discussions

2. Résultats et discussions

2.1. Isolement des neutrophiles

Avant l'isolement et le dénombrement des polynucléaires neutrophiles, nous avons réalisé un frottis du sang total dans le but de visualiser ces différentes composantes comme le montre la figure 11.

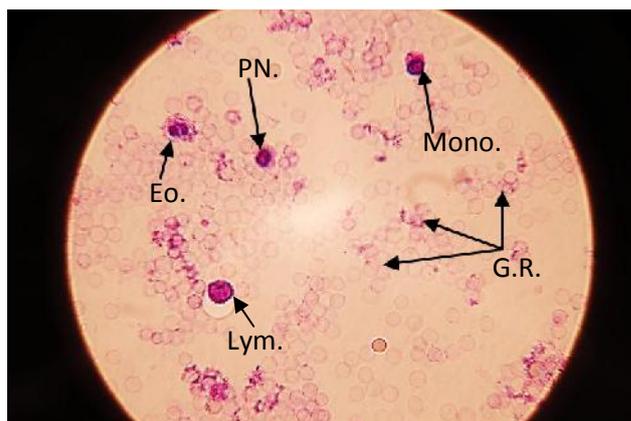


Figure 11. Morphologie des cellules sanguines révélées au cristal violet sous microscope photonique au grossissement X 100. Eo : Eosinophile ; Mono : Monocyte ; Lym : Lymphocyte ; PN : polynucléaire neutrophile ; G.R : Globule rouge.

Après l'isolement des neutrophiles, ils sont visualisés sous microscope photonique avec le cristal violet qui nous permet de colorer le noyau des cellules comme le montre la figure 12.



Figure 12. Morphologie des neutrophiles observés sous microscope photonique au grossissement X 40.

2.2. Caractérisation de l'extrait de *Vitis vinifera*

2.2.1. Dosage des polyphénols présent dans l'extrait de *Vitis vinifera*

La concentration des polyphénols dans l'extrait *Vitis vinifera* que nous avons obtenue dans notre étude (284 mg EAG/100g) est plus faible en comparaison avec celle de *Vitis vinifera* (2306±17 mg EAG/100g de MS) trouvée par ZEGHAD *et al.* (2019).

Cette différence peut être expliquée par le fait que chaque partie du raisin a une composition en polyphénols différente. La nature et la concentration de ces composés varient selon l'origine géographique du raisin, le cépage, la composition du sol, le climat, les pratiques de culture (VISLOCKY AND FERNANDEZ, 2010 ; XIA *et al.*, 2010).

2.2.2. Dosage des flavonoïdes présent dans l'extrait de *Vitis vinifera*

La teneur moyenne en flavonoïdes dans l'extrait de *Vitis vinifera* est déterminée par la méthode de COSTA *et al.* (2016). Cette teneur en flavonoïdes est déterminée en équivalent de quercétine.

La concentration des flavonoïdes dans l'extrait *Vitis vinifera* que nous avons obtenue est de 52 mg EQ /100g. Ces résultats sont semblables aux données de MAKRIS *et al.* (2006) qui ont trouvé des teneurs en flavonoïdes dans les raisins *Vitis vinifera* qui varient entre 9,9mg EQ/100g MS et 57,15 mg EQ/100g MS.

2.2.3. Dosage des sucres réducteurs présents dans l'extrait de *Vitis vinifera*

Les sucres de la vigne proviennent de la photosynthèse. Ils sont composés essentiellement de glucose et de fructose. A la maturité, ces deux sucres sont en quantités sensiblement égales, avec toujours un excès de fructose. Le saccharose n'est présent dans le raisin qu'à l'état de traces. Par contre, il a été identifié de nombreux sucres tels l'arabinose, la xylose, le maltose ou encore le raffinose.

La teneur en sucres de raisins varie entre 150 et 250 g/L. Toutefois, cette teneur en sucres peut aller jusqu'à 300 g/L cas du Muscat. Cette différence est due au fait que le sucre est réparti de façon inéquitable entre les différents grains et même à l'intérieur d'un même grain (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1980). La concentration des sucres réducteurs dans l'extrait *Vitis vinifera* a été déterminée par la méthode de DNS. Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude montrent une concentration de 0,84g/l pour le fructose et de 0,81g/l pour le glucose.

Notre intérêt au taux de sucres dans l'extrait se justifie par sa texture en caramel, en effet leur abondance dans l'extrait brut peut contribuer en partie à l'effet antioxydant attribué à cette variété.

2.3. Effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la viabilité des neutrophiles

L'évaluation de la cytotoxicité de l'extrait sur les polynucléaires neutrophiles a été réalisée en utilisant le bleu de trypan. Les neutrophiles morts prennent une coloration bleue foncée suite à la pénétration irréversible du colorant, tant dis que les cellules vivantes expulsent le colorant et restent incolores comme le montre la figure suivante :

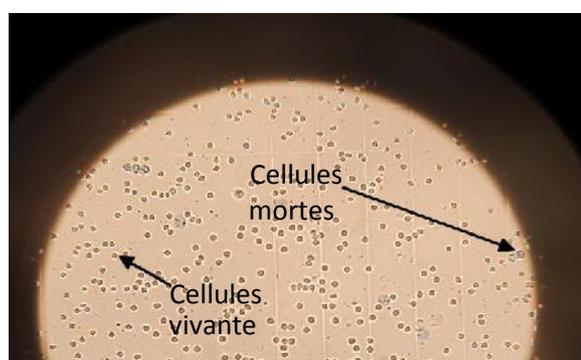


Figure 13. Dénombrement des neutrophiles observés sous microscope photonique au grossissement X 40.

Après traitement des PN à l'extrait de *Vitis vinifera*, un dénombrement s'effectue en comptant les PN morts colorés en bleu foncé par le bleu de trypan sur 100 cellules pour chaque dilution [0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; contrôle] $\mu\text{g/ml}$. Le nombre de cellules comptabilisées est représenté en pourcentage et reflète la moyenne de trois tests. L'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la viabilité des polynucléaires neutrophiles est représenté sur l'histogramme (Figure 14).

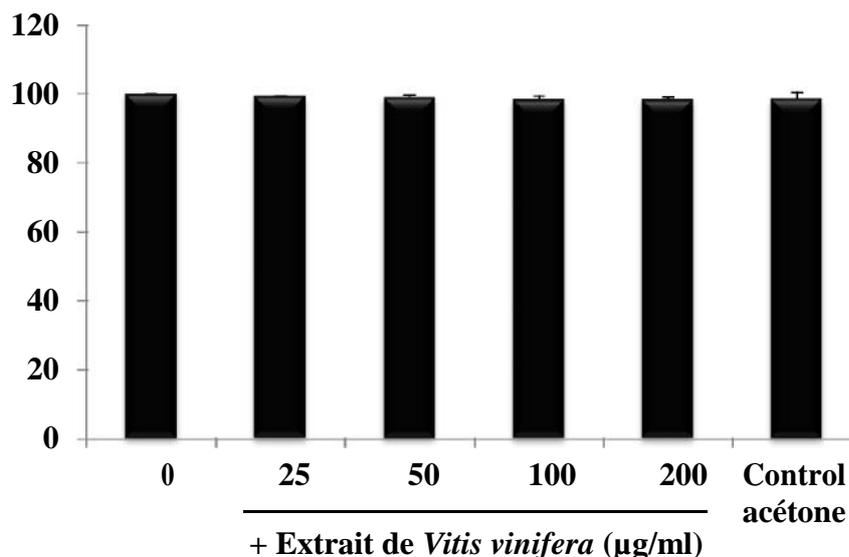


Figure 14. Effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la viabilité des PNs

Nos résultats, illustrés dans la figure 19, ont montrés qu'en comparaison avec le contrôle négatif [0 µg/ml], l'extrait n'a eu aucun effet toxique sur les neutrophiles, le taux de viabilité des neutrophiles dépasse 98%, même à des concentrations élevés de l'extrait, le taux de cellules mortes est donc non significatif. Du côté du contrôle acétone qui est dépourvu de l'extrait, nous n'avons pas eu d'effet cytotoxique puisque le taux de viabilité dépasse aussi les 98%.

En effet, de part sa non toxicité vis-à-vis des cellules, cet extrait riche en molécules anti oxydantes peut-être intéressant pour l'usage cosmétologique ou pharmacologique si l'on vérifie la biodisponibilité de ses biomolécules (YADAV *et al.*, 2009). Tout comme les extraits des raisins, les composés de *Vitis vinifera* ont de puissantes propriétés antioxydants, ainsi en combinaison ils offrent aux cellules une protection musclée contre les dommages des radicaux libres et soutiennent la fonction immunitaire (CASTILLA et ECHARRI, 2006).

2.4. Effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur l'adhérence des neutrophiles

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur l'adhérence des PN, nous avons procédé à un test d'adhérence des neutrophiles, par l'ajout de concentration croissantes de l'extrait de *Vitis vinifera*. Après incubation pendant 15 min à 37°C, les surnageants composés de cellules, d'extrait et de PBS présents dans les boîtes de Pétri sont aspirés afin de faire un dénombrement sous microscope photonique, des cellules non adhérentes en allant de gauche à droite. Cette opération se fait le long de trois lignes pour avoir une moyenne. Un contrôle d'acétone est effectué en le préparant dans les mêmes conditions que le test de viabilité. Le résultat de dénombrement est représenté en pourcentage reflétant la moyenne de trois tests. Ceci est représenté sur l'histogramme de la figure 15.

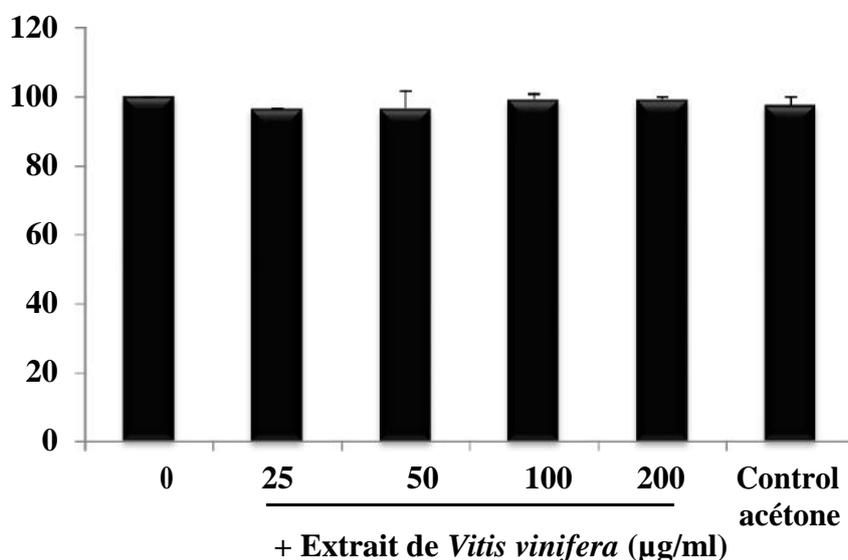


Figure 15. Effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur l'adhérence des polynucléaires neutrophiles

Les PN ont été incubés avec un gradient de concentration croissant de *Vitis vinifera* [0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200] µg/ml et un contrôle d'acétone 0.01%, pendant 15 min à 37°C. Le taux de cellules adhérentes est déterminé par un dénombrement sous microscope photonique des cellules non adhérentes avec le cristal violet. Ce résultat représente la moyenne de trois essais.

Nos résultats montrent que le taux des PN adhérentes ne diminue pas même à des concentrations élevées en comparaison au contrôle négatif [0µg/ml].

Ces résultats montrent que l'extrait de *Vitis vinifera* n'affecte pas l'adhérence des polynucléaires même à des concentrations élevées de l'extrait.

Du côté du contrôle acétone, où les cellules n'ont pas été traitées à l'extrait, nous n'avons pas remarqué de diminution du taux des PN adhérentes qui suggère que l'acétone n'a pas d'effet sur de l'adhérence des PN. Les résultats obtenus pour ce test ne témoignent d'aucun effet inhibiteur de l'extrait sur l'adhésion des cellules. Par ailleurs, des études ont montrées que les polyphénols ont une action sur les molécules d'adhésion. Ils sont capables également d'atténuer et de limiter la migration des neutrophiles au niveau du site de l'inflammation en agissant sur l'expression des MMPS. L'administration d'oleuropéoside empêche l'expression de MMP-9 dans un modèle de colite induite par le DSS chez les souris (GINER *et al.*, 2011). Dans un modèle de colite induite par le DNBS chez le rat, le verbascoside diminue également l'expression de MMP-2 et MMP-9 (MAZZON *et al.*, 2009).

L'expression des marqueurs impliqués dans l'inflammation peut être affectée aussi par les polyphénols, une étude sur les souris a mis en évidence l'effet de la naringénine sur la diminution de la migration des cellules immunitaires vers la muqueuse colique induite par le DSS en diminuant l'expression des molécules d'adhésion telles que ICAM1 au niveau colique (DOU *et al.*, 2013), de la même manière, le resvératrol diminue le taux colique et sérique d'ICAM-1 dans un modèle induit par le TNBS (ABDALLAH et ISMAEL, 2011). Un extrait de thé vert réduit également la surexpression d'ICAM-1 induite par le DNBS chez le rat (MAZZON *et al.*, 2005).

Cependant, l'administration d'un jus de raisin dans l'eau de boisson des animaux ne corrige pas l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 induite par le TNBS (PAIOTTI *et al.*, 2013). Ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* l'adhérence des neutrophiles.

En plus de dénombrement des cellules non adhérentes qui sont en suspensions, nous avons observé sous microscope inversé les fonds des boîtes de Pétri les cellules adhérentes afin de confirmer les résultats en amont. Les tapis des cellules adhérentes pour chaque dilution et le contrôle sont pris en photos et représentés dans la figure 16.

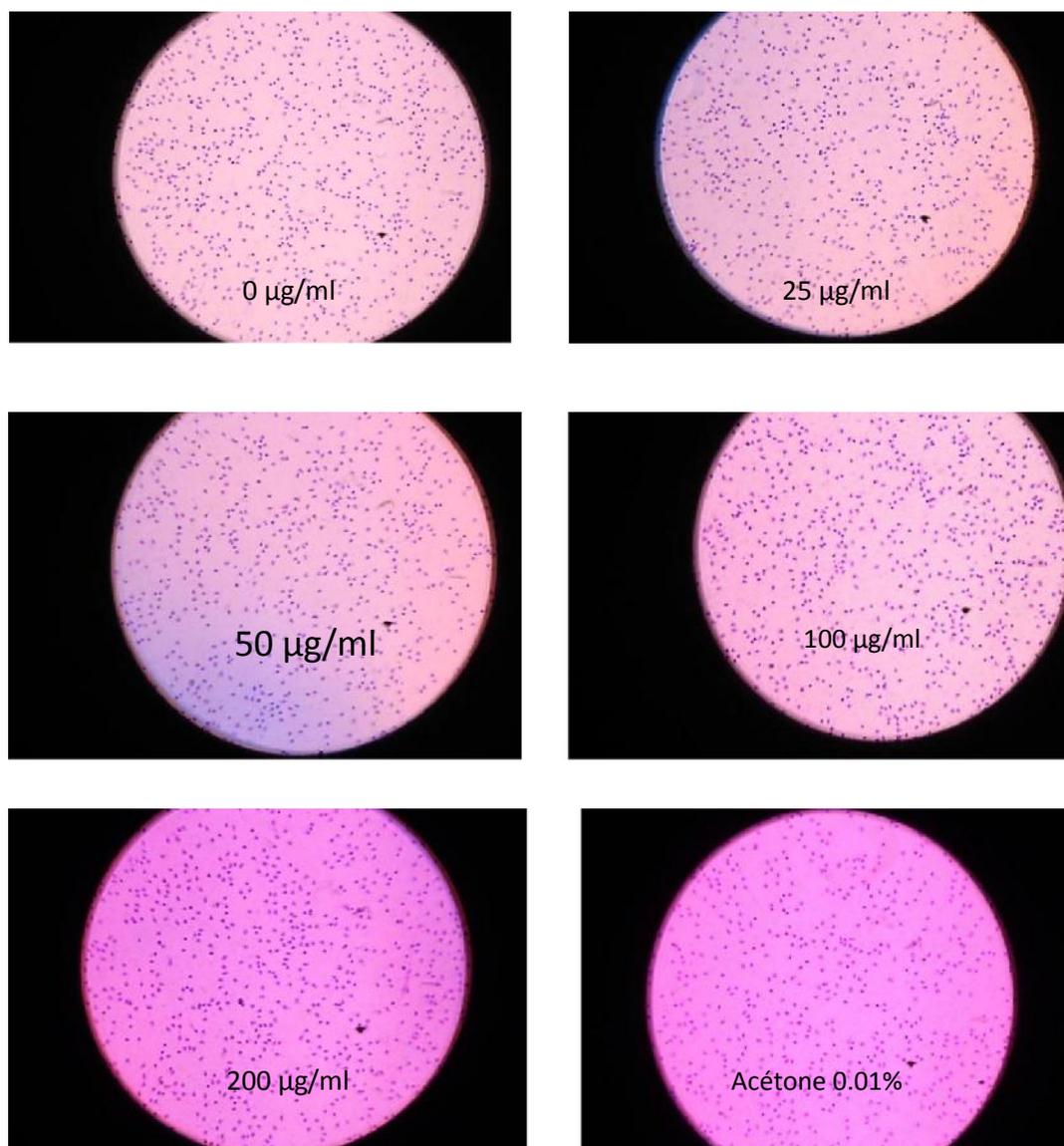


Figure 16. Les neutrophiles adhérents traités à l'extrait de *Vitis vinifera* observés sous microscope inversé au grossissement X 20.

2.5. Effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la dégranulation des neutrophiles

Pour tester l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la dégranulation des PNs, ces dernières ont été incubées avec des concentrations croissantes de l'extrait de *Vitis vinifera* [25 ; 50 ; 100 ; 200] µg/ml et ensuite stimulées au fMLP et traitées avec la cytochalasine B.

Trois contrôles ont été réalisés : un contrôle négatif représentant les cellules au repos, un contrôle positif contenant les cellules stimulées au fMLP et un contrôle à acétone de 0.01%. Après l'arrêt de la réaction par la centrifugation, les surnageants ont été récupérés dans le but de faire un dosage des protéines sécrétées en utilisant la BSA comme protéine de référence

[0 ; 30 ; 50 ; 80 ; 100] $\mu\text{g/ml}$ et d'évaluer l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur l'activité de la myéloperoxydase (MPO).

2.5.1. Dosage des protéines sécrétoires du neutrophile

Les résultats du dosage des protéines sécrétoires ont montrés que leur concentration dans le contrôle négatif est de $33\mu\text{g/ml}$ qui est inférieure à celle du contrôle positif estimé à $55.5\mu\text{g/ml}$.

Du côté des surnageants issus des cellules traitées avec des concentrations croissantes de l'extrait de *Vitis vinifera*, les résultats ont montrés des concentrations protéiques qui varient de $44\mu\text{g/ml}$ pour les concentrations 25 et $50\mu\text{g/ml}$ et de 19 et $30.5\mu\text{g/ml}$ de protéines pour les concentrations 100 et $200\mu\text{g/ml}$ de l'extrait de *Vitis vinifera*.

Le contrôle acétonique à montré une concentration en protéines de $39\mu\text{g/ml}$ qui légèrement inférieure à celle du contrôle positif. Cette variation des contenus protéiques peut être expliquée par la différence d'âge, sexe, poids et de l'intensité de la sensibilité du système immunitaire de chaque individu. Les résultats sont montrés dans le tableau ci dessous

Tableau IV. La concentration des protéines sécrétoires des neutrophiles.

	Cellules au repos	Cellules stimulées	Acétone 10 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait	50 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait	100 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait	200 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait
[protéine] $\mu\text{g/ml}$	33	55.5	39	44	44	19	30.5

2.5.2. Effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur l'activité de la myéloperoxydase

Les résultats de l'activité de la MPO sont représentés en pourcentage reflétant la moyenne de 3 répétitions, ceci est représenté dans la figure 17.

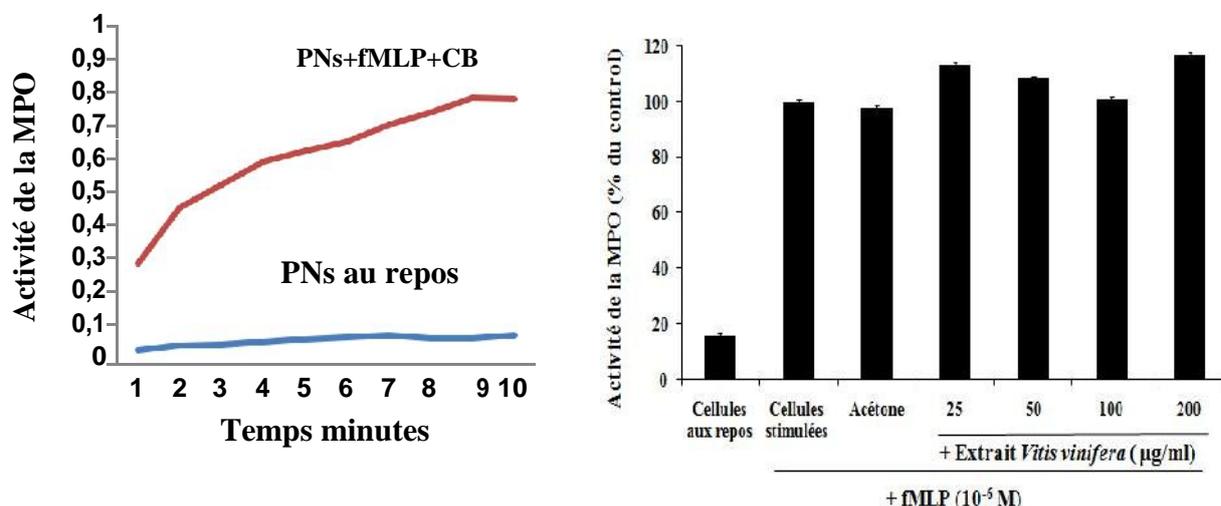


Figure 17. Effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur la dégranulation des neutrophiles.

Selon les résultats obtenus, nous avons constaté que les PNs aux repos traités uniquement avec la cytochalasine B, ne montrent aucune activité de la MPO comparés au contrôle positif où les cellules sont stimulées avec du fMLP, ce qui signifie que le test est validé (graphe de gauche). Dans l'histogramme de la figure 22, nous montrons les résultats de plusieurs expériences, où nous avons comparé l'activité de la myeloperoxydase pour tous les surnageants traités à l'extrait par rapport à celle du contrôle positif, qui représente 100% d'activité.

Du côté des surnageants où les PNs sont traités avec des concentrations croissantes de l'extrait de *Vitis vinifera*, de la cytochalasine B et stimulés au fMLP, les résultats obtenus montrent des activités de la MPO qui avoisinent celle du contrôle positif, ceci montre que l'extrait de *Vitis vinifera* ne présente aucun effet sur l'activité de la MPO. Le contrôle d'acétone, où les cellules n'ont pas été traitées avec l'extrait, a montré une activité de la MPO semblable à celle obtenue chez le contrôle positif, donc l'acétone n'affecte pas l'activité de la MPO.

Lors de l'inflammation, les PNs infiltreront la muqueuse colique et secrètent la MPO dont l'activité est considérée comme un marqueur de l'inflammation. La plupart des polyphénols étudiés limitent l'infiltration de la muqueuse colique par ces cellules immunitaires, ce qui se manifeste par une diminution de l'activité de la MPO. Ainsi plusieurs polyphénols (picéatannol, curcumine) limitent l'augmentation de l'activité de la MPO induite par le DSS

(CAMACHO-BARQUERO *et al.*, 2007 ; DEGUCHI *et al.*, 2007 ; KIM *et al.*, 2008 ARAFA *et al.*, 2009).

Toutefois chez des souris recevant du DSS, l'acide ellagique ne réduit pas l'activité de cette enzyme (MARIN *et al.*, 2013). Chez des rats, l'acide ellagique, la curcumine, le resvératrol corrigent l'augmentation de l'activité de la MPO induite par le TNBS (MARTIN *et al.*, 2004 ; MOCHIZUKI et HASEGAWA, 2005 ; MARTIN *et al.*, 2006 ; YAO *et al.*, 2010 ; ROSILLO *et al.*, 2012;).

Des effets bénéfiques vis-à-vis de la MPO ont été également décrits pour des extraits végétaux riches en polyphénols. Ainsi, un traitement curatif par un extrait de cacao lors d'une colite induite par le DSS réduit de 64 % l'activité de la MPO (ANDUJAR *et al.*, 2011). Un effet similaire a été observé pour un extrait de thé vert dans un modèle d'inflammation induite par le DNBS (acide dinitrobenzène sulfonique) (MAZZON *et al.*, 2005). Des extraits de raisin modulent également l'infiltration colique par les neutrophiles. La consommation d'une suspension de vin rouge désalcoolisée prévient significativement l'augmentation de la MPO chez des rats dont l'inflammation est induite par une carence en zinc (CANALI *et al.*, 2000). L'expression du gène et de la protéine de la MPO est atténuée par une supplémentation à long terme en extrait de pépins de raisin chez des souris déficientes pour le gène de l'IL-10 (WANG *et al.*, 2013). Dans un modèle de colite induite par le TNBS chez le rat, des effets similaires ont été observés au niveau colique et plasmatique après administration par gavage d'un extrait de pépins de raisin riche en proanthocyanidines (LI *et al.*, 2008 ; WANG *et al.*, 2010).

Cependant, quelques études ont montré que certains polyphénols ne limitent pas l'inflammation. C'est le cas de l'épicatéchine qui, administré chez le rat dans un modèle d'inflammation colique aiguë ou chronique induite par le TNBS, ne réduit pas l'activité de cette enzyme malgré une réduction de l'infiltration des PNs observée sur les coupes histologiques (VASCONCELOS *et al.*, 2012). Le verbascoside administré à des souris ne diminue pas l'activité MPO lors d'une inflammation aiguë induite par le DSS mais la réduit lors d'une inflammation chronique (HAUSMANN *et al.*, 2007). De la même manière, des auteurs ont montré que le rutoside n'affecte pas l'activité de la MPO après induction d'une inflammation colique par le DSS (GINER *et al.*, 2011).

Conclusion

Les polynucléaires neutrophiles, ou « sentinelles de l'immunité », ont un potentiel antimicrobien important et jouent un rôle central dans la réaction inflammatoire. Néanmoins, des lésions peuvent être occasionnée suite à leur sur-activation et/ou accumulation dans le site infecté, provoquant ainsi la libération de substances nocives telles que les formes réactives de l'oxygène (FRO) et des molécules protéolytiques, à l'origine de pathologies inflammatoires ou de leur aggravation. Dans ce contexte, des biomolécules sont actuellement proposées pour moduler les réactions inflammatoires, dont en exemple notre extrait de *vitis vinifera* au potentiel anti-oxydant confirmé.

Un extrait acétonique de *Vitis vinifera* nous a été fourni, pour lequel nous avons dédié une caractérisation biochimique ainsi qu'une l'évaluation de la cytotoxicité vis-à-vis de neutrophiles humains, avec deux test sur l'adhérence et la dégranulation de ces cellules.

En effet, nous sommes arrivés à conclure que l'extrait de la variété de *Vitis vinifera* a une concentration de 284 mg EAG/100g en composés polyphénoliques totaux, de 52 mg EQ /100g flavonoïdes et de 0,84g/l pour le fructose et de 0,81g/l pour le glucose. L'extrait de *Vitis vinifera* n'a présenté aucun effet toxique sur les neutrophiles. Il s'ajoute à cela que l'extrait n'interfère aucunement avec les propriétés du neutrophile notamment l'adhérence mais aussi avec la fonction de dégranulation.

Si l'on englobe la totalité de nos résultats, nous pouvons dire que cet extrait relativement riche en polyphénols et en flavonoïdes, peu éventuellement être utilisé pour ses vertus anti oxydantes, d'autant plus qu'il ne présente aucun effet cytotoxique pour les cellules humaines et n'interfère pas avec le bon fonctionnement des neutrophiles humains. Ces molécules peuvent être proposées comme molécules thérapeutique grâce à leur innocuité et d'absence d'effet inducteur et/ou inhibiteur sur l'adhérence et la dégranulation des neutrophiles qui représente le pivot de la défense immunitaire.

Ce travail reste incomplet de par la caractérisation de l'extrait, il serait souhaitable :

D'identifier les différents composants de cette variété de raisin ;

Tester l'effet antibactérien de cet extrait ;

Déterminer la part anti-oxydante des polyphénols et des flavonoides, en s'écartant des sucres présents dans l'extrait.

Références bibliographiques

A

ABBAS A.K., LICHTMAN A.H. et PILLAI S. (2012). Innate *immunity* in: *Cellular and molecular immunology*. Edit., Elsevier Saunders, USA. PP, 56-89.

ABDALLAH D. M. et ISMAEL N. R. (2011). Resveratrol abrogates adhesion molecules and protects against TNBS-induced ulcerative colitis in rats. *Can J Physiol Phamacol*, 89, 811-818.

ANDÚJAR, M. C. RECIO, R. M. GINER, J. L. RÍOS. (2011). "Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *J Agric Food Chem*, 59(12), 6474-6483.

ARAI Y., TAKANASHI H., KITAGAWA H., OKAYASU I. (1998). Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Cytokine*, 10(11), 890- 896.

ARTOLI A.M., SEQUEIRA A., SILVA-HERDADE A.S. et SALDANHA C. (2007). Leukocytes rolling and recruitment by endothelial cells:hemorheological experiments and numerical simulations: *Journal of Biomechanics*,40, 3493-3502.

B

BORJESSO D.L., KOBAYASHI S.D., WHITNEY A.R., VOYICH J.M., ARGUE C.M. et DELEO F.R. (2005). Insights into pathogen immune evasion mechanisms: Anaplasma phagocytophilum fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *The Journal of Immunology*, 174, 6364-6372.

BORREGAARD N (2010). Neutrophils, from marrow to microbes,*Immunity*, 33,657-670.

BORREGAARD N. et COWLAND J.B. (1997). Granuls of neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89, 3503-3521.

BORREGAARD N., SORENSEN O.E. et THEILGAARD-MÖNCH K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology*, 28, 340-345.

BOUAOUINAM., HALBWACHS-MECARELLI L. (2006). Activation des intégrines et adhérence des leucocytes et des plaquettes : Nouvelles données sur des voies de signalisation communes. *Hématologie*, 12, 21-33.

BRINKMANN V. et ZYCHLINSKY (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin. *J CellBiol*, 198(5), 773-783.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie-Plantes médicinales, 3^{ème} Ed., Techniques et documentations, Paris.

C

CABANIS J. C., CABANIS M.T., CHEYNIER V. et TEISSEDRE P.L. (1998). Caractérisation de la matière première et des produits élaborés ; In : « C. Flanzly » éd. Œnologie, fondements scientifiques et technologiques. Lavoisier, Tec & Doc, pp. 291-336.

CABANIS J.C., CABANIS M.T., CHEYNIER V. et TEISSEDRE P.L. OENO. (1998). Fond. Sc. Tech., London-New York-Paris, 321-331.

CAMACHO-BARQUERO L., VILLEGASI, SANCHEZ-CALVO J.M., TALERO E., SANCHEZ-FIDALGO S., MOTILVA V., ALARCON DE LA LASTRA C. (2007). Curcumin, a Curcuma long a constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol*, 7(3), 333-342.

CANALI R., VIGNOLINI F., NOBILIF. et MENGHERI E. (2000). Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant(CINC)expression by red wine expression by red wine polyphenols in zinc deficiency induced intestinal damage of rat. *Free RadicBiol Med*, 28(11), 1661-1670.

CARUSO R.A., FEDELE F FINOCCHIARO G et VENUTI A.A. (2012). Neutrophil-tumor cell phagocytosis (Cannibalism) in human tumors: an update and literature review. *ExpOncol*, 34(3), 303-311.

CASTILLA P., ECHARRI R. et AM J CLINNUTR A.L. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Jul*, 84(1), 252-62.

CHANG C.C., YANG M.H., WEN H.M. et CHERN, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10.

CHIRA K., SUH J.H., SAUCIER C. et TEISSÉDRE P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6,75 –82.

COSTA M.F., JESUS T.I., LOPES B.R., ANGOLINI C.F., MONTAGNOLLI A., GOMES L.P., PEREIRA G.S., RUIZ A.L., CARVALHO J.E., EBERLIN M.N., DOS SANTOS C. et TOLEDO K.A. (2016). BMC Complement Altern Med. . Eugenia aurata and Eugenia punicifolia HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release, 16(1), 403.

COWBURN A.S., CONDLIFFE A.M., FARAHI N., SUMMERS C. et CHILVERS E.R. (2008). Advances in neutrophil biology: clinical implications. *Chest*, 134, 606-12.

CURNUTTE J.T. (1993). Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol*, 67 (3 Pt 2). p. S2-15.

D

DANG P.M.C., RAAD H., DERKAWI R.A., BOUSSETTA T., ACLET M.H., BELAMBRI S-A., MAKNI-MAALEJ K., KROVIARSKI Y., MOREL F., GOUGEROT-POCIDALO M.A. et EI-BENNA J. (2011). The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochemical Pharmacology* (Inpres).

D'ARCHIVIO, M., FILESI C., VARI R., SCAZZOCCHIO B. et MASELLA R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci*, 11(4), 1321-1342.

DEGUCHI Y., ANDOH A., INATOMI O., YAGI Y., BAMBIA S. et ARAKI Y. (2007). Curcumin prevents the development of dextran sulfate Sodium (DSS)-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci*, 52(11), 2993-2998.

DELBOSC S., CRISTOI J P., DESCOMPS B., CHENARD J., et SIROIS P. (2001). Oxygen and the superoxide anion. Modulation of NADPH oxidase. *ISoc.Bio*, 195(4), p.401-411.

DESCAMPS-LATSCHA B. et WITKO-SARSAT V. (1999). Relation polynucléaires neutrophiles et monocytes-macrophages. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 39, 241-247.

DISTASI M.R. et LEY K. (2009). Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends in Immunology*, 30, 547-556.

DOU W., ZHANG J., SUN A., ZHANGE., DING L. et MUKHERJEE S. (2013). Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF-kappaB signaling. *Br J Nutr*, 110(4), 599-608.

E

ENTMAN M.L., LANE C.L., BEAUDET A.L., TY T.I., YOUKERK. et HAWKINSHK. (1992). Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest*, 90(4), p. 1335-1345.

F

FAURSCHAU M. et BORREGAARD N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection*, 5, 1317-1327.

FIRESTEIN G.S. (1992). Mechanisms of tissue destruction and cellular activation in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 4(3), p. 348-54.

G

GABORSKI T.R., CLARK A., WAUGH R.E. et MCGRATH J.L. (2008). Membrane mobility of $\alpha 2$ integrins and rolling associated adhesion molecules in resting neutrophils. *Biophysical Journal*, 95, 4934-4947.

GALET P. (1993) : Précis de viticulture. 6^{ème} Ed. DEHAN, 582 p.

GALET P. (2000) : Précis de viticulture. 7^{ème} Ed. DEHAN, 602 p.

GALLI S.J., BORREGAARD N. et WYNNTA (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*, 12(11), 1035-1044.

- GALLIN J.I. (1985).** Neutrophil specific granule deficiency. *Annu Rev Med*, 36: p.263-74.
- GARY W. et ARIANNA C. (2010).** Polyphenol content and health benefits of raisins. *Nutr. Res.* 30, 511–519.
- GAUDRY M., ROBERGE C.J., DE MEDICIS R., LUSSIER A. et POUBELLE P.E. (1993).** Crystal-induced neutrophil activation. III. Inflammatory microcrystals induce a distinct pattern of tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Clin Invest*, 91(4), p. 1649-55.
- GINER E., ANDUJARI., RECIO M.C. ET RIOS J.L. (2011).** Oleuropein ameliorates acute colitis in mice. *J Agric Food Chem*, 59(24), 12882-12892.
- GOMEZ C. (2009).** Etude des mécanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisins. Caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués dans ces mécanismes. Thèse de Doctorat en Sciences des Procédés – Sciences des Aliments. Centre international d'études supérieures en Sciences Agronomiques Montpellier Supagro .p.5.
- GOUGEROT-POCIDALO M.A. (2002).** Polynucléaires neutrophiles humains. *Revue Française des Laboratoires*, 341, 43-51.
- GOUGEROT-POCIDALO M.A. (2012).** The neutrophil and systemic inflammation. *Joint Bone Spine*, 79(3), 209-211.
- GOUGEROT-POCIDALO M.A. et HALBAWACHS-MECARELLI L. (2005).** L'activation du polynucléaire neutrophile dans la synovite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme*, 72, 303-309.
- GOUGEROT-POCIDALO M.A., EL BENNA J., ELBIM C., CHOLLET-MARTIN S. et DANG M.C. (2002).** Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Soc Biol*, 196(1), p. 37-46.
- GOUGEROT-POCIDALO M.A., ELBIM C., DANG P.M.C. et EL BANNA J. (2006).** Déficiences fonctionnelles primitives des polynucléaires neutrophiles. *La presse médicale*, 35, 871-878.
- GREENLEE-WACKER M.C., RIGBY K.M., KOBAYASHI S.D. et PORTER A.R. (2014).** Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human Neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. *J Immunol*, 192(10), p. 4709-17.

GULLBERG U., BENGTSSON N., BÜLOW E., GARWICZ D., LINDMARK A. et OLSSON I. (1999). Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, 232, 201-210.

GUO R.F. et WARD P.A. (2002). Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 303-310.

H

HAUSMANN M., OBERMEIER F., PAPER D.H., BALAN K., DUNGER N., MENZEL K. et FALK W. (2007). In vivo treatment with the herbal phenyl ethanoidacteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol*, 148(2), 373-381.

HUSSAIN S. et DAVANGER S. (2011). The discovery of the soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex and the molecular regulation of synaptic vesicle transmitter release: the 2010 kavli prize in neuroscience. *Neuroscience*, 190, 12-20.

J

JACQUES MACHEIX J., FLEURIETI A. et ALLEMND C.J. (2005). Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolite secondaires d'importance économique). Ed, Presse polytechniques et universitaires romandes : Italie.

K

KANTARI C., PEDERZOLI-RIBEIL M. et WITKO-SARSAT V. (2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Trends in Innate Immunity*, 15, 118-146.

KAPLAN M.J. et RRADIC M. (2012). Neutrophil extracellular traps: Double-Edge Swords of innate immunity. *J Immunol*, 189, 2689-2695.

KATALINIC V., MILOS M., KULISIC T. et JUKIC. (2006). Screening of 70, medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557.

KIM Y.H., KWON H.S., KIM D.H., CHO H.J., LEE H.S. et JUN J.G. (2008). Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int Immunol*

pharmacol,8 (12), 1695-1702.

KRASIK E.F., CAPUTO K.E., HAMMER et HAMMER D.A. (2008). Adhesion dynamics simulation of neutrophil arrest with stochastic activation. *Biophysical Journal*, 95, 1716-1728.

L

LACY P. (2005). The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacology and Therapeutics*, 107, 358-376.

LI X.L., CAI Y.Q., QINH. et WU Y.J. (2008). Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Can J PhysiolPharmacol*, 86(12), 841-849.

LIGETI E. et MÓCSAI A. (1999). Exocytosis of Neutrophil Granulocytes. *Biochemical Pharmacology*, 57,1209-1214.

LINDMARK I.M., KARLSSON A., SERRANDER L., FRANCOIS P., LEW D., RASMUSSEN B., STENDAHL O. et NÜ E O. (2002). Synaptotagmin II could confer Ca²⁺ sensitivity to phagocytosis in human neutrophils. *Biochimica et BiophysicaActa*,1590, 159-166.

LIU L. et KUBES P. (2003). Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organ-specific mechanisms of action. *ThrombHaemost*, 89, 213-20.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. (1951). *J Biol Chem.* Nov; 193(1), 265-75.

LUGASIA., HOVARI J., SAGIK. et BIRO L. (2003). The Role Of Antioxidant Phytonutrients In The Prevention Of Diseases.*J.Acta.Biologica. Szegediensis*, 47 (14), 119-125 (Cited InMohammedi Z, (2005)).

LUNN D.P. et HURLEY D.J. (2009). The role of leukocyte biology in *laminitis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129, 158-160.

M

MAKRIS D.M., Boskou G. et Andrikopoulos N.K. (2006). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-product employing water/ethanol mixtures. *BioresourcesTechnology*.

MARIN M., MARIA GINER R., RIOS J. L. E.T. et RECIO M. C. (2013). Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. *J Ethnopharmacol*, 150(3), 925-934.

MARTIN A.R., VILLEGASI, LA CASAC, DE LA LASTRA CA. (2004). Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *BiochemPharmacol*, 67(7), 1399-1410.

MARTIN A.R., VILLEGASI, SANCHEZ-HIDALGO M. et DE LA LASTRA CA. (2006). The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol*, 147(8), 873-885.

MARTIN C., BURDON P.C.E., BRIDGER G., GUTIERREZ-RAMOS J.C., WILLIAMS T.J. et RANKIN S.M. (2003). chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 19, 583-593.

MASSENET C., CHENAVES S., COHEN-ADDAD C., DAGHER M.C., BRANDOLIN G., PEBAY-PEVROULA E., et FIESCHI F. (2005). Effects of p47*phox* C Terminus Phosphorylations on Binding Interactions with p40*phox* and p67*phox*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 13752-13761.

MATTHEWS R., PEHRSSON P. et FARHAT-SABET M. (1987). Sugar Content of Selected Foods: Individual and Total Sugars. Department of Agriculture Home Economics Research, United States, 39 pp.

MAZZON E, MUIA C, DI PAOLA R, GENOVESE T. (2005). Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radical Res*, 39(9), 1017-1025.

MAZZON E., ESPOSITO E., DI PAOLA R., RICCARDI L. et CAMINITI R. (2009). Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis. *NaunynSchmiedebergs Arch Pharmacol*, 380(1), 79-94.

MEHTA D. et MALIK A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological Reviews*, 86, 279-367.

MIYAKE Y. et S. YAMASAKI (2012). Sensing necrotic cells. *AdvExp Med Biol*, 738, p.144-52.

MOCHIZUKI M. et N. HASEGAWA (2005). Protective effect of (-)-epigallocatechin gallate on acute experimental colitis. *J Health Sci*, 51, 362-364.

MOLLINDO F., PEREZ-SALA D., GAJATE C., JIMENEZ B., RODRIGUEZ P. et LACAL J.C. (1993). Localisation of rap 1 and rap2 proteins and the gelatinase-containing granules of human neutrophils. *Federation of European Biochemical Societies*, 326, 209-214.

MURPHY R. et DECOURSEY T.E. (2006). Charge compensation during the phagocyte respiratory burst. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757, 996-1011.

N

NAUSEEF W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view, *Immunol Rev*, 219, 88-102.

NUSSE O. et LINDAU M. (1988). The dynamics of exocytosis in human neutrophils. *The J. of Cell Bio*, 107,2117-2123.

NUUTILA J., JALAVA-KARVINEN P., HOHENTHAL U., LAITINEN I., KOTILAINEN P., RAJAMAKI A., NIKOSKELAINEN J. et LILIUS E.M. (2009). Comparison of degranulation of easily mobilizable intracellular granules by human phagocytes in healthy subjects and patients with infectious diseases. *Human Immunology*,70, 813-819.

O

OTTONELLO L., CUTOLO M., FRUMENTO G., ARDUINO N., BERTOLOTTO M., MANCINI M., SOTTOFATTORI E. et DALLEGRI F. (2002). Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and pro inflammatory cytokines. *Rheumatology Oxford J*, 41, 1249–1260.

P

PAIOTTI A.P., NETO R.A., MARCHI P., SILVA R.M., PAZINE V.L. et NOGUTI J. (2013).The anti-inflammatory potential of phenolic compounds in grape juice concentrate (G8000) on 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis.*Br J Nutr*, 110(6), 973-980.

PETERSON G. L. (1977). Anal Biochem, 83, 346.

R

REYNIER A. (2007). Manuel de viticulture. Ed Lavoisier, Paris.532p. **RIBÉREAU-**

GAYON J. et PEYNAUD E. (1980). Sciences et techniques de la vigne, traité d'ampélogie. Tome 1. Ed. DUNOD. Paris. 725p.

RIBÉREAU-GAYON P., DUBOURDIEU D., DONECHE B. et LONVAUD A. (1998). Les composés phénoliques. In '*Chimie du vin - Stabilisation et traitements. Traité d'Oenologie.*' Tome III. Paris. Ed. Dunod. pp. 163-237.

ROSENBAUER F. et TENEN D.G. (2007) Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* , **7**, 105–117.

ROSILLO M.A., SÁNCHEZ-HIDALGO M., CÁRDENO A., APARICIO-SOTOM., SÁNCHEZ-FIDALGO S., VILLEGAS I. et DE LA LASTRA C.A. (2012). Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res*, 66(3), 235-242.

S

SARANTIS H. et GRINSTEIN S. (2012). Subversion of phagocytosis for pathogen survival. *Cell Host & Microbe*, 12, 419-431.

SEGAL A.W. (2005). How Neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23, 197-223.

SEYOUM A., ASRES K. et EL-FIKY F.K. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058-2070.

SINGLETON V.L. et ROSSI J.A (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic reagents. *Am J Enol Vitic*, 16, 144-158.

SRILAKSHMI B. (2006). Nutrition Science, 4th ed. New Age International Ltd. Publishers, Daryaganj, New Delhi.

STOUT A.B. (1936). Breeding for hardy seedless grapes. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 34, 416-42.

T

THEILGAARD-MÖNCH K., PORSE B. et BORREGARD N. (2006). Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Current Opinion in Immunology*,18, 54-60.

TÖZEREN A. et LEY K. (1992). How do selectins mediate leukocyte rolling in venules *Biophysical Journal*, 63, 700-709.

U

UEYAMA T., TATSUNO T. KAWASAKI T., TSUJIBE S., SHIRAI Y., SUMIMOTO H., LETO T.L. et SAITO N. A. (2007). Regulated Adaptor Function of p40*phox*: Distinct p67*phox* Membrane Targeting by p40*phox* and by p47*phox*. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 441-454.

V

VASCONCELOS P.C., SEITO L.N., DI STASI L.C. et AKIKO HIRUMA-LIMA C. (2012). Epicatechin used in the treatment of intestinal inflammatory disease: an analysis by experimental models. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 508902.

VERMERRIS W. et NICHOLSON R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Ed, Springer: U.S.A.

VISLOCKY. L. M. et M. L. FERNANDES (2010). Biomedical effects of grape products. *Nutr. Rev.*, 68(11), 656-670.

W

WAGNER J.G. et ROTH R.A. (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *PharmacolRev*, 52, 349-374.

WANG H., XUE Y., ZHANG H., HUANG Y., YANG G. et DU M. (2013). Dietary grape seed extract ameliorates symptoms of inflammatory bowel disease in IL10-deficient mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(12), 2253-2257.

WANG Y.H., YANG X.L., WANG L., CUI M.X., CAI YQ, LI X.L. et WU Y.J. (2010). Effects of proanthocyanidins from grape seed on treatment of recurrent ulcerative colitis in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 88(9), 888- 898.

WEISS S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 320(6), p.365-76.

WERNER E. (2004). GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *Journal of Cell Science*, 117, 143-153. A.

WITKO-SARSAT V. (2012). Les cellules de l'immunité innée In : *Immunologie*. 6^{ème} éd. Paris.

WITKO-SARSAT V., RIEU P., DESCAMPS-LATSC B., LESAVRE P. et HALBWACHS-MECARELLI L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, 80, 617-53.

X

XIA E.Q., DENG G.F., GUO YJ. et LI H.B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci*, 11, 622–646.

Y

YADAV D.N., PATKI P.E., SRIHARI S.P., SHARMA G.K. et BAWA A.S. (2009). Studies on polyphenol oxidase activity of heat stabilized whole wheat flour and its chapatti making quality. *International Journal of Food Properties*, 13 (1), 142-154.

YAO J., WANG J.Y., LIU L., LI Y.X., XUN A.Y. et ZENG W.S. (2010). Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch Med Res*, 41(4), 288-294

YEONSOO K., STEVEN R., HEIDI K. et CRAIG O. (2008). Raisins are a low to moderate glycemic index food with a correspondingly low insulin index. *Nutr Res*, 28, 304–308.

Z

ZEGHAD N., EJAZ A., BELKHIRI A., VANDER HEYDEN Y. et DEMEYER K. (2019). Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon* 5 e0 1575.

ZEN K., CUI L.B., ZHANG C.Y., et LIU Y. (2007). Critical role of Mac-1 sialyllewis x moieties in regulating neutrophil degranulation and transmigration. *Journal of Molecular Biology*, 374, 54-63.

ZOECKLEIN B., KENNETH C., FUGELSAN G., BARRY H., GUMP., FRED S. et NURY. (1995). Wine analysis and production. New York, Chapman & Hall, p99–208.

Annexes

Annexe 1. Tableau représentant la Préparation des solutions utilisées au laboratoire

Solutions	Protocole de préparation
Ficoll et NaCl 0.9%	Prêt à l'emploi.
Dextran 2%	Dextran-T 500 à 2% préparé à l'avance dans du NaCl 0.9 %, puis filtré à l'aide d'un microfiltre de 0.22µm. Cette solution est conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.
NaCl 1.8%	On pèse 1.8 g de poudre de NaCl, qu'on dissous dans 100 ml d'eau distillée.
NaCl 0.2%	On pèse 0.2 g de poudre de NaCl, qu'on dissous dans 100 ml d'eau distillée.
PBS	Diluer du KCl (2.68 mM) +NaHPO ₄ 2(H ₂ O ₂) (8.10 mM) +KH ₂ PO ₄ (1.21 Mm) +NaCl (0.14 Mm), dans 100 ml d'eau distillée, puis ajuster le pH à 7.3 avec du NaOH (1N), filtré et conservé à 4°C.

Annexe 2. Les pourcentages de l'effet de l'extrait de *Vitis vinifera* sur l'activité de la MPO

[Echantillon] µg/ml	Négatif	Positif	Acétone	25	50	100	200
l'effet de l'extrait sur l'activité de la MPO %	15,976246	100	98,0263843	113,083858	108,383812	100,980819	116,898724

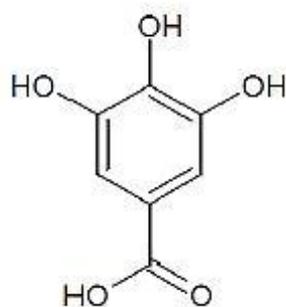
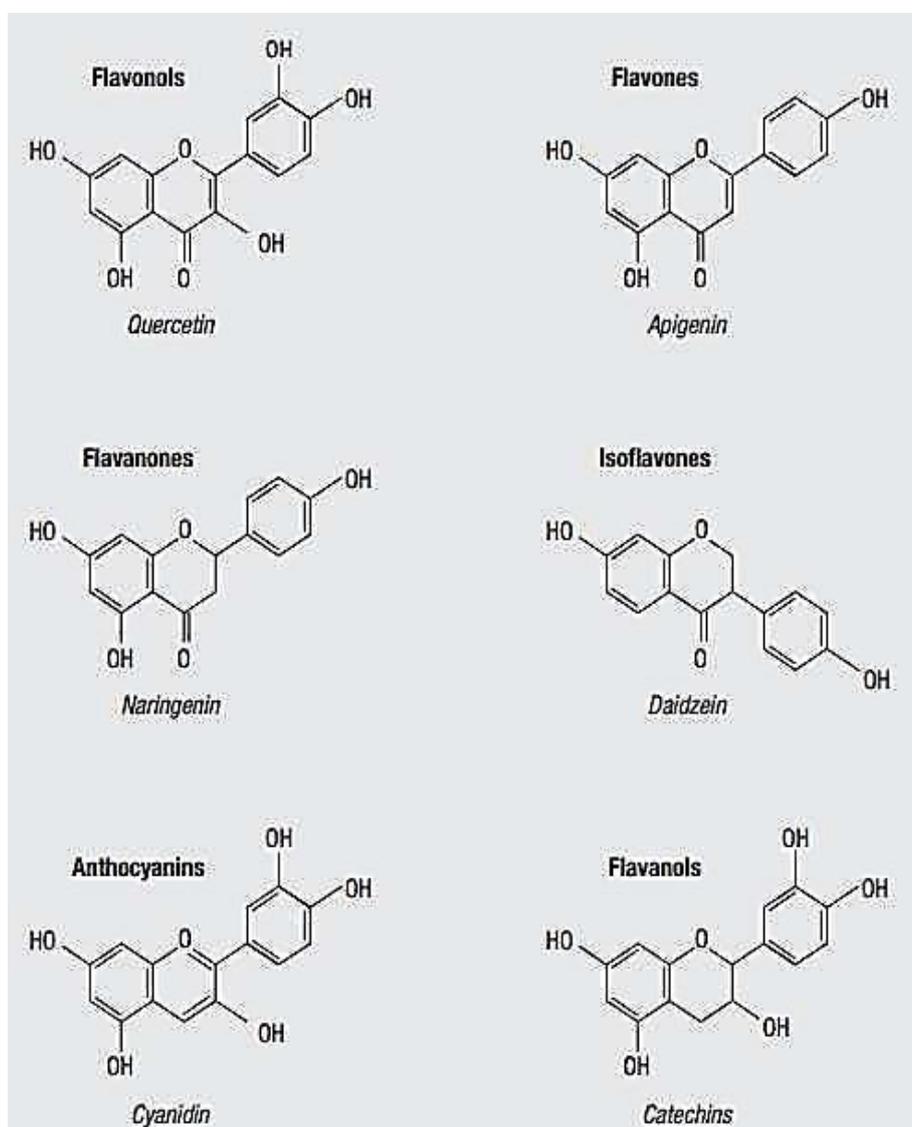
Annexe 3. Tableau représentant la Gamme étalon du glucose et du fructose

[glucose/fructose] g/l	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Réactif DNS (ml)	2	2	2	2	2	2

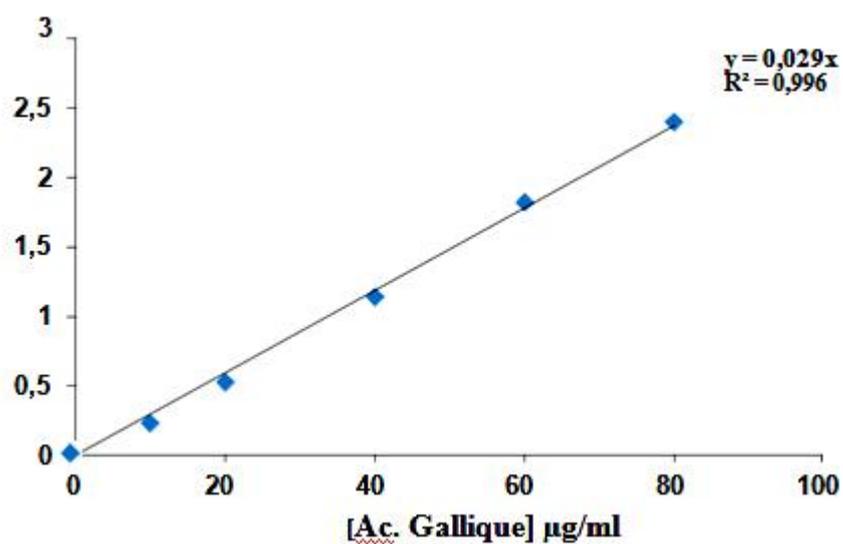
Annexe 4. Tableau représentant les poids moléculaires des différentes molécules chimiques composants toutes les solutions utilisées

Molécules	Poids moléculaires (g/mol)
HCl (1N)	36.46
KCl	74.5513
KH₂PO₄	136.086
MgSO₄	120.366
Na₂CO₃ anhydre	105.99
Na₂HPO₄·2(H₂O)	141.96
NaCl	58.4
NaHPO₄, 12H₂O	358.1422
NaOH	39.997
Acétate de potassium(C₂H₃KO₂)	98.1423
Acide Gallique(C₇H₆O₅)	188.14
Fructose (C₆H₁₂O₆)	180.16
Glucose (C₆H₁₂O₆)	180.156

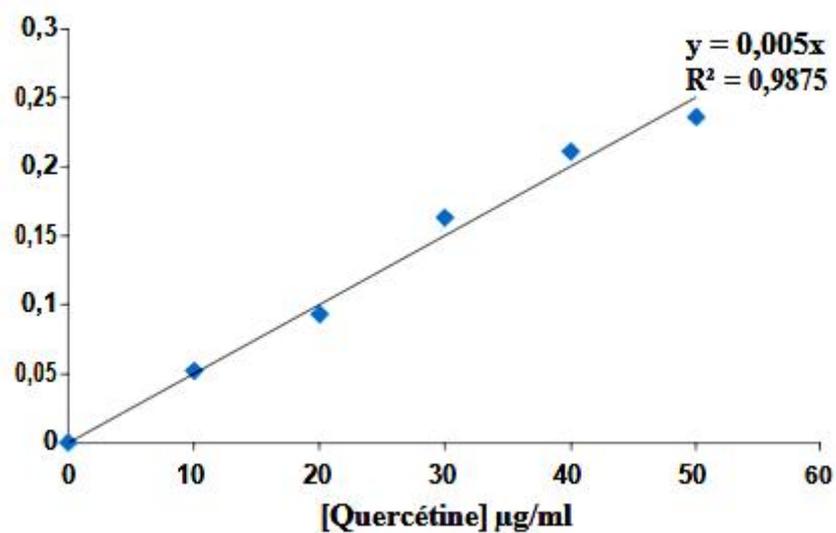
Annexe 5. Structure de l'acide gallique

Annexe 6. Structure des différents flavonoïdes (D'Archivio *et al.*, 2010)

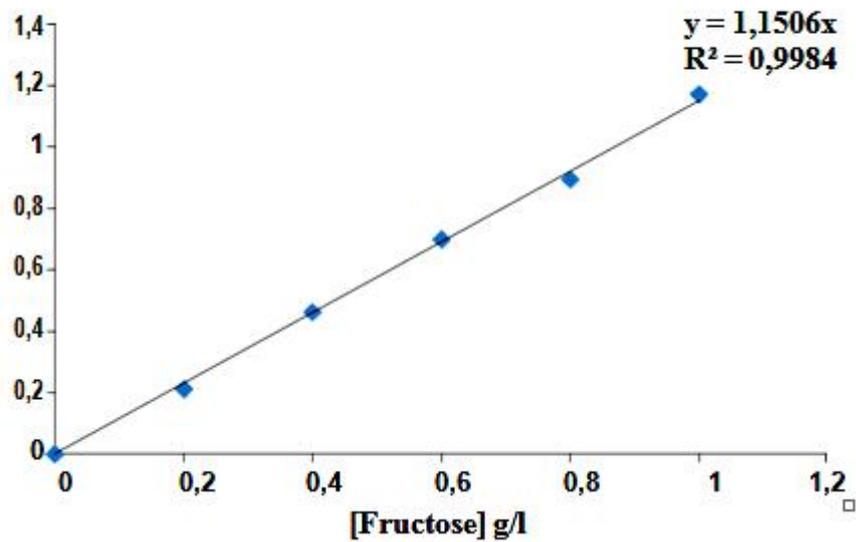
Annexe 7. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.



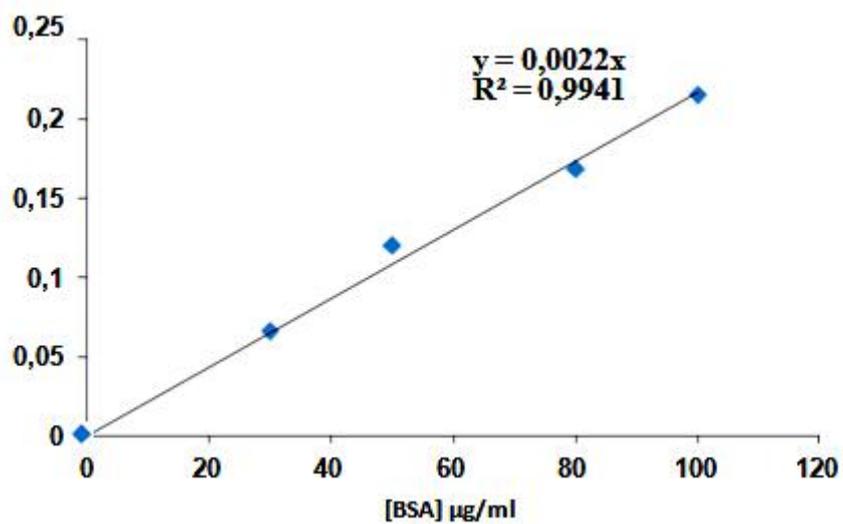
Annexe 8. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.



Annexe 9. Courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs.



Annexe 10. Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines sécrétoires du neutrophile.



Résumé

Les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux, ils sont fabriqués dans la moelle osseuse. Après leur maturation, ils passent dans le sang circulant où ils gagnent les tissus infectés à la rencontre de micro-organismes pathogènes, participent ainsi aux phénomènes inflammatoires. Cependant la sur-activation et l'accumulation prolongée et irrégulière de ces neutrophiles engendrent des substances hautement toxiques tels que les formes réactives de l'oxygène induisant ainsi des maladies inflammatoires graves. Des mécanismes de contrôle rigoureux doivent donc exister pour limiter la sur-activation de ces cellules et dans le but de renforcer ces mécanismes, de nombreuses recherches en phytothérapie ont été faites par l'utilisation de certaines plantes ayant des molécules bioactives, notamment le raisin *Vitis vinifera* et ces dérivés qui renferment des polyphénols, flavonoïdes et des sucres présentant des propriétés biologiques intéressantes comme les activités anti-oxydantes, anti-cancérogènes, anti-inflammatoires et antivirales. Les propriétés multifonctionnelles et l'abondance des neutrophiles dans la circulation sanguine ont fait d'elle un bon objet d'étude. Le présent travail a été entrepris dans le but de faire une caractérisation de l'extrait acétonique de *Vitis vinifera* par la détermination de sa teneur en polyphénols, flavonoïdes, glucose et fructose. Un test d'évaluation de l'effet cytotoxique de cet extrait a été réalisé sur les neutrophiles par la méthode d'exclusion du bleu de trypan, l'utilisation de boîte de Petri pour le comptage des cellules adhérentes et sur la dégranulation des polynucléaires neutrophiles suite à leur stimulation par le fMLP. Les résultats ont montré une teneur de 284 mg EAG/100g pour les polyphénols et de 52 mg EQ /100g pour les flavonoïdes et des quantités sensiblement égales en glucose et en fructose de 0,81g/l ; 0,84g/l, respectivement. L'extrait acétonique de *Vitis vinifera* a montré une absence d'effet significatif sur la mortalité, l'adhérence et la dégranulation des neutrophiles.

Mots clés : Neutrophiles, *Vitis vinifera*, polyphénols, flavonoïdes, cytotoxicité, adhérence, dégranulation.

Summary

Neutrophils play an essential role in defending the host against infectious agents, they are made in the bone marrow. After maturation, they pass into the circulating blood where they reach infected tissues where they meet pathogenic microorganisms, thus participating in inflammatory phenomena. However, the over-activation and prolonged and irregular accumulation of these neutrophils generate highly toxic substances such as reactive forms of oxygen, thus inducing serious inflammation diseases. Strict control mechanisms must therefore exist to limit the over-activation of these cells and in order to strengthen these mechanisms. Many phytotherapy research has been carried out using some plants with bioactive molecules, in particular the *Vitis vinifera* grape and these derivatives which contain polyphenols, flavonoids and sugars with interesting biological properties such as antioxidant, anti-cancer, anti-inflammatory and antiviral activities. The multifunctional properties and abundance of neutrophils in the bloodstream have made it a good subject for study. This work was undertaken to characterize the acetone extract of *Vitis vinifera* by determining its content of polyphenols, flavonoids, glucose and fructose. A test to evaluate the cytotoxic effect of this extract was performed on neutrophils by the trypan blue exclusion method, the use of Petri dishes for counting adherent cells and on the degranulation of neutrophil polynuclear cells following their stimulation by the fMLP. The results showed a content of 284 mg EAG/100g for polyphenols and 52 mg EQ/100g for flavonoids and substantially equal amounts of glucose and fructose of 0.81g/l; 0.84g/l, respectively. The acetone extract of *Vitis vinifera* will show no significant effect on neutrophil mortality, adherence and degranulation.

Keywords : Neutrophils, *Vitis vinifera*, polyphenols, flavonoids, cytotoxicity, adhesion, degranulation.