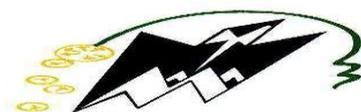


République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou  
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques  
Département de Biochimie-Microbiologie



## Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie Appliquée

### Thème

**L'effet de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei*  
sur quelques fonctions du neutrophile humain.**

Réalisé par :

M<sup>elle</sup> AIT RAMDANE Lila

M<sup>elle</sup> BOUCEKRANE Rezika

Soutenu le 16/ 07/2019 devant le jury :

Mme BEDOUHENE Samia	Maitre de conférences classe B	Promotrice
Mme ZENNIA Saliha	Maitre de conférences classe B	Présidente
Mme ALMI Dalila	Maitre de conférences classe B	Examinatrice
Mme SENNANI Nassima	Maitre de conférences classe B	Examinatrice

2018/2019

## ***Remerciements***

*Tout d'abord nous tenons à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail.*

*En tout premier lieu nous remercions particulièrement Mme BEDOUHENE S, pour avoir encadré et dirigé ce travail, tout au long de sa réalisation et pour ses précieux conseils.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Mme IRATNI G et Monsieur HOUALI K.*

*Nous remercions également:*

*Mme ZENNIA S d'avoir accepté de présider notre jury.*

*Mme ALMI D et Mme SENNANI N d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nos profonds remerciements vont également à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Merci à toute l'équipe de laboratoire.*

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce travail :*

*A mes parents qui ont toujours été là pour m'aider et me soutenir.*

*A mes frères.*

*A toute ma famille.*

*A mes amis et mes collègues.*

*A mon binôme Rezika.*

***Lila***

*Je dédie ce travail :*

*A ma chère mère qui a toujours été là pour m'aider et m'encourager.*

*A la mémoire de mon père. Puisse dieu, le tout puissant, l'avoir en sa miséricorde.*

*A mes frères et mes sœurs.*

*A toute ma famille.*

*A mes amis et mes collègues.*

*A mon binôme Lila.*

***Rezika***

## Sommaire

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction ..... 1

### Partie I : Synthèse bibliographique

1. Le neutrophile humain..... 2

1.1. Origine et formation du neutrophile..... 2

1.2. La maturation du neutrophile ..... 4

1.3. Les propriétés du neutrophile ..... 7

1.3.1. Le chimiotactisme ..... 7

1.3.2. L'adhérence et la migration..... 8

1.4. Les fonctions du neutrophile ..... 9

1.4.1. La phagocytose et la présentation d'antigène ..... 9

1.4.2. La bactéricidie ..... 10

1.5. La régulation de l'activité du neutrophile ..... 12

### 2. *Phlomis bovei*

2.1. La Présentation de *Phlomis bovei* ..... 14

2.1.1. La Classification et la description botanique ..... 14

2.2. La Composition phytochimique ..... 15

2.3. Usages traditionnels et effets biologiques ..... 17

## **Partie II : Partie expérimentale**

### **1. Matériel et méthodes**

1.1. Matériel .....	18
1.2. Méthodes .....	19
1.2.1. Isolement et dénombrement des neutrophiles .....	19
1.2.2. Dénombrement des neutrophiles .....	21
1.2.3. Préparation et caractérisation de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Phlomis bovei</i> .....	22
1.2.3.1. Préparation de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Phlomis bovei</i> .....	22
1.2.3.2. Dosage des flavonoïdes .....	23
1.2.3.3. Dosage des polyphénols .....	24
1.2.4. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Phlomis bovei</i> .....	26
1.2.5. Evaluation de l'effet de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Phlomis bovei</i> sur l'adhérence des neutrophiles .....	26
1.2.6. Evaluation de l'effet de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Phlomis bovei</i> sur la dégranulation des polynucléaires neutrophiles .....	27
<b>2. Résultats et discussion .....</b>	<b>30</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>38</b>

### **Références bibliographiques**

### **Annexe**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Origine des cellules sanguines.....	3
<b>Figure 2</b> :Schéma de la migration chimiotactique des leucocytes vers un site d'inflammation .....	8
<b>Figure 3</b> : Migration cellulaire du neutrophile .....	9
<b>Figure 4</b> : Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la présentation des antigènes aux cellules de l'immunité adaptative : fonction de CPA.....	10
<b>Figure 5</b> : Phagocytose et métabolisme oxydatif du neutrophile .....	11
<b>Figure 6</b> : Présentation des parties aériennes de <i>Phlomis bovei</i> .....	15
<b>Figure 7</b> : Protocole expérimentale d'isolement du neutrophile humain à partir du sang frais .....	20
<b>Figure 8</b> : Dénombrement des neutrophiles sur une cellule de malassez.....	22
<b>Figure 9</b> : Protocole de dosage des flavonoïdes .....	23
<b>Figure 10</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	24
<b>Figure 11</b> : Protocole de dosage des polyphénols .....	25
<b>Figure 12</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique .....	25
<b>Figure 13</b> : Photos du test d'adhérence sur boîtes de pétrie .....	26
<b>Figure 14</b> : Courbe d'étalonnage de la BSA .....	28
<b>Figure 15</b> : Observation de cellules sanguines en microscopie photonique au G x 100.....	30
<b>Figure 16</b> : Observation de neutrophiles en microscopie photonique au G x 40 .....	31
<b>Figure 17</b> : Dénombrement des cellules mortes sous microscope photonique G x 40.....	33
<b>Figure 18</b> : Observation de neutrophiles adhérents sous microscope inversé au G x 4 .....	34
<b>Figure 19</b> : Mesure de l'activité de la myéloperoxydase.....	36

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Le contenu des granules des neutrophiles .....	6
<b>Tableau II</b> : Principales protéines antimicrobiennes et leurs mécanismes d'action .....	12
<b>Tableau III</b> : Classification botanique de <i>Phlomis bovei</i> .....	14
<b>Tableau IV</b> : Composés chimiques rencontrés dans l'espèce <i>Phlomis bovei</i> .....	16
<b>Tableau V</b> : Quantité de protéines dans le surnageant des neutrophiles .....	37

## Liste des abréviations

BSA : Bovine Sérum Albumin.

DMSO : Di MéthylSulfOxide.

DO : Densité Optique.

CCR/CXCR : Récepteur de la famille de chimiokines CC/CXC

CD62E : E-sélectine.

CD62L : L-sélectine.

CD62P : P-sélectine.

EAG : Equivalent d'Acide Gallique.

EDTA : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid.

EQ : Equivalent de Quercétine.

FMLP: formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine.

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor.

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyded'hydrogène.

HOCl :Acidehypochloreux

ICAM : IntercellularAdhesionMolecules.

LPS : Lipopolysaccharide.

LTB<sub>4</sub> : Leucotriène B<sub>4</sub>.

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase.

MPO : Myéloperoxydase.

MMP : Métalloprotéase matricielle.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné.

NET : Neutrophil Extracellular Traps.

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase.

PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

PMA: PhorbolMyristateacetate.

PTEN :Phosphatase and Tension Homologue

FRO : Forme Réactive de l'Oxygène.

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule.

## Résumé

Des données récentes montrent que certains métabolites secondaires issus de quelques plantes médicinales, tels que les polyphénols et les flavonoïdes ont de nombreuses vertus pour la santé et présentent des effets pharmacologiques intéressants. Dans ce contexte, en utilisant le neutrophile humain comme modèle cellulaire, nous avons évalué les effets d'un extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei*, sur l'adhérence et la dégranulation de ces cellules, mécanismes importants dans la réaction inflammatoire médiée par le PN. Nous avons caractérisé le lyophilisat de *Phlomis* issus de l'infusion par dosage des flavonoïdes et des polyphénols présents à raison de  $25 \pm 2,3$  mg EQ/g et  $56 \pm 4$  mg EAG/g d'extrait respectivement. Par la méthode de Dextran-ficoll nous avons isolé des PNs humains à partir de sang frais. Nous avons évalué la cytotoxicité de l'extrait aqueux de feuilles sur ces derniers en utilisant la méthode d'exclusion au bleu de trypan, ainsi que son effet sur l'adhérence et la dégranulation avec le PMA (phorbolmyristateacetate) comme stimulant. D'après nos résultats, l'extrait n'a pas montré d'effet cytotoxique envers les PNs y compris aux plus fortes doses (200µg/ml). L'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* a montré un effet inhibiteur intéressant sur la dégranulation des neutrophiles induite par le PMA, en effet le taux d'inhibition de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) était d'environ 50% à 50µg/ml d'extrait. Soulignant que la MPO est un marqueur spécifique des granules azurophiles, jouant un rôle important dans l'élimination des pathogènes. L'adhérence des cellules n'a pas été affectée par l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* quel que soit sa concentration. Nos résultats suggèrent que cet extrait aqueux de feuilles est capable de moduler la réponse inflammatoire en diminuant la dégranulation et réduire ainsi les pathologies associées à l'hyper activation des PNs, à savoir l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, en plus de n'avoir aucune cytotoxicité envers les cellules, ni d'interférence avec leur adhésion.

**Mots clés :** *Phlomis bovei*, Flavonoïdes, Polyphénols, Neutrophiles, Adhérence, Dégranulation.

## **Abstract**

Recent data showed that some secondary metabolites from medicinal plants, such as polyphenols and flavonoids, have many health benefits and interesting pharmacological effects. In this context, using human neutrophil as a cellular model, we evaluated the effects of an aqueous extract of *Phlomis bovei* leaves on the adherence and degranulation of these cells, important mechanisms in the PN-mediated inflammatory response. We started with a characterization of the freeze-dried extract resulting from the infusion of the plant by measuring flavonoids and polyphenols. With the Dextran-ficoll method we isolated human neutrophils from fresh blood. We evaluated the cytotoxicity of the extract on the latter using the trypan blue exclusion method, as well as its effect on adherence and degranulation with the PMA stimulation (phorbolmyristate acetate). From our results, it was found that the extract had no effect on cell viability, even at the highest dose (200 $\mu$ g/ml). The extract showed an interesting inhibitory effect on PMA-induced PN degranulation, as the inhibition rate of myeloperoxidase (MPO) activity was about 50% to 50 $\mu$ g/ml of the extract. Noting that MPO is a specific marker of degranulation that plays an important role in the elimination of pathogens. Cell adhesion was not affected by the extract regardless of the concentration of the extract. Our results suggest that this aqueous extract is able to modulate the inflammatory response by decreasing degranulation and thus reduce pathologies associated with PNs hyper activation, such as asthma, rheumatoid arthritis, in addition to having no cytotoxicity to cells.

**Key words:** *Phlomis bovei*, Flavonoids, Polyphenols, Neutrophils, Adhesion, Degranulation.

### Introduction

Les polynucléaires neutrophiles humains sont une des premières barrières de défense lors de l'introduction d'un agent pathogène dans l'organisme (JANEWAY *et al.*, 2003). Ils constituent un puissant système de défense contre les agents pathogènes, principalement les bactéries et les champignons, mais aussi contre des cellules ou des molécules endogènes altérées (GALKINA *et al.*, 2017). Les fonctions des neutrophiles ont longtemps été restreintes à leur rôle de cellules phagocytaires « tueuses ». Ils jouent en fait un rôle beaucoup plus complexe, participant à l'engagement et à la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives ainsi qu'à l'homéostasie tissulaire (DUPONT, 2018).

L'essentiel des molécules intervenant dans les fonctions des polynucléaires neutrophiles, est synthétisées et stockées dans les granulations apparaissant au cours de la granulopoïèse. La dégranulation permet une libération des molécules contenues dans les granulations, intervenant dans la régulation des réponses immunitaires de l'hôte et dans les réparations tissulaires. Les neutrophiles activés par un agent pathogène sont le plus souvent bénéfiques à l'organisme en participant à son élimination. Cependant, leur activation excessive par la libération de produits oxydatifs peut conduire à des lésions tissulaires sévères, impliquées dans la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires aiguës ou chroniques (GOUGEROT-POCIDALO *et al.*, 2002). Malgré la diversité des traitements de ces maladies inflammatoires, le recours à la médecine traditionnelle reste intéressant en utilisant des plantes médicinales qui présentent un intérêt thérapeutique important. Dans cette optique, nous avons tenté de caractériser et d'évaluer les effets de l'extrait aqueux de feuilles du *Phlomis bovei* sur une propriété et une fonction du neutrophile humain. Les applications de cette plante sont très variées, à savoir en cosmétique, en cuisine, en phytothérapie et en aromathérapie. Ces nombreuses utilisations sont confortées par la richesse en plusieurs molécules douées d'activités biologiques comme les polyphénols, les flavonoïdes, les phenylpropanoïdes et les phenylethanoïdes.

Notre travail se divise en deux parties, dont une partie bibliographique dans laquelle nous rappelons les propriétés et les fonctions du neutrophile ainsi que les propriétés biologiques de l'espèce *Phlomis bovei*, une partie expérimentale, dans laquelle nous décrivons la méthodologie suivie pour les différents tests réalisés sur les PN à savoir la cytotoxicité, l'adhérence et la dégranulation.

**Synthèse**  
**Bibliographique**

# **Le neutrophile humain**

### 1. Le neutrophile humain

Le neutrophile humain, aussi appelé leucocyte polymorphonucléaire est de forme arrondie ayant entre 10 à 14  $\mu\text{m}$  de diamètre, dont le noyau mature présente deux à cinq lobes et possédant des granulations cytoplasmiques spécifiques. Il est le leucocyte le plus abondant dans la circulation sanguine, représentant environ 60% de la population leucocytaire circulante. Découvert par Paul Ehrlich suite au raffinement des techniques de marquage, le terme neutrophile réfère à la possibilité de marquer ce leucocyte simultanément avec des colorants acides et basiques, produisant ainsi une coloration neutre (BORREGAARD et COWLAND, 1997). Il est un des acteurs principaux de l'immunité innée en tant que premier leucocyte présent au niveau du site inflammatoire ainsi que par sa capacité à phagocyter et à dégrader un large éventail de pathogènes. Sa durée de vie se compte en heures (6 à 10 heures) dans la circulation sanguine alors qu'il peut vivre jusqu'à 4 ou 5 jours une fois passé au niveau des tissus et stimulé de façon appropriée. Dans la sous-famille des granulocytes, les neutrophiles sont les plus nombreux, constituant à eux seuls plus de 95% de cette population cellulaire totale, tandis que les éosinophiles et les basophiles représentent respectivement environ 4% et 1% de cette classe. Les polynucléaires neutrophiles sont répartis en deux parties : une partie circulante c'est-à-dire les neutrophiles se trouvent libres dans la circulation sanguine et une partie marginale c'est-à-dire les neutrophiles plaqués contre les parois des vaisseaux et se trouvent adhérents à l'endothélium sachant que la répartition entre les deux compartiments est équivalente (MICHAUD, 2009).

#### 1.1. Origine et formation du neutrophile

Toutes les cellules sanguines, bien que démontrant une grande variabilité fonctionnelle et morphologique, proviennent des mêmes précurseurs. Le polynucléaire neutrophile est formé dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique. Selon les concentrations et les facteurs de croissance qui l'entourent, cette cellule peut se différencier et devenir une cellule progénitrice myéloïde, menant à la formation des monocytes, des macrophages et des neutrophiles, ou se transformer en cellule lymphoïde, menant à la formation des lymphocytes. La présence combinée de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor) et d'interleukine (IL)-3 favorise la différenciation de la lignée myéloïde et l'addition d'IL-6 permet d'avancer un peu plus dans la cascade jusqu'au progéniteur des granulocyte/macrophages.

Il suffit ensuite que ce précurseur soit en présence de GM-CSF et de G-CSF et qu'il subisse quelques étapes de maturation supplémentaires pour finalement donner un neutrophile prêt à passer dans la circulation sanguine et à défendre l'organisme (ST-ONGE, 2005) (figure 1).

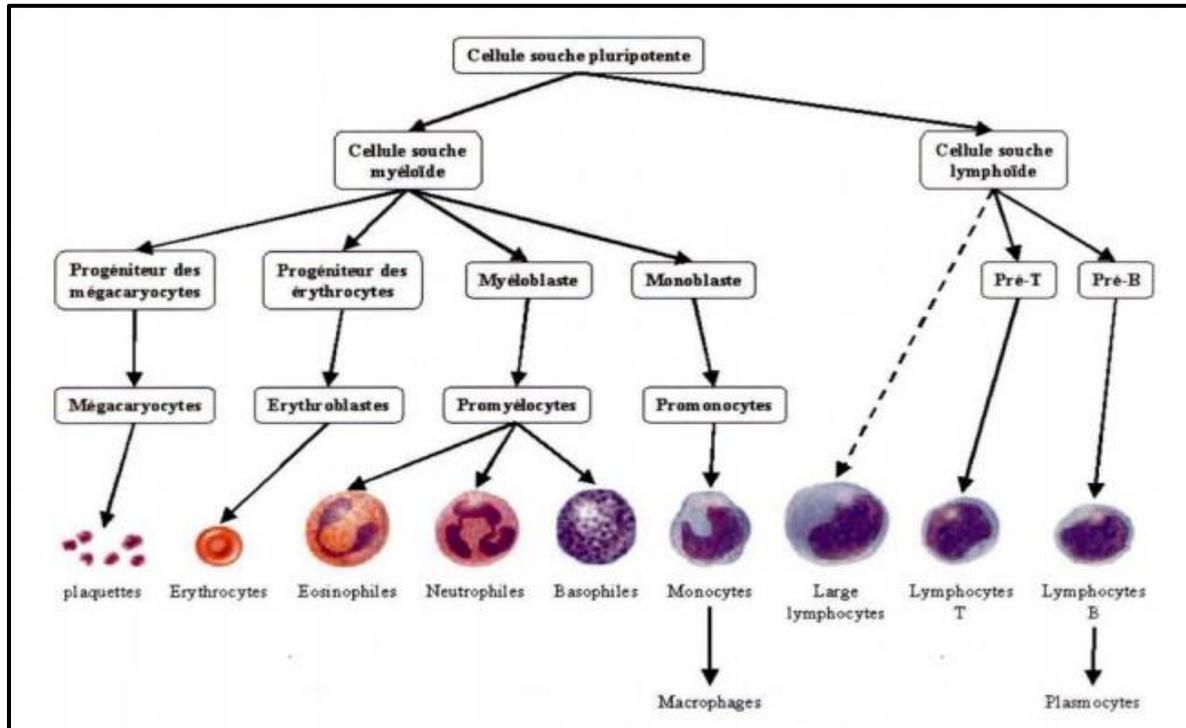


Figure 1 : Origine des cellules sanguines (EDWARDS, 1994).

Chez l'adulte sain, les polynucléaires neutrophiles représentent la majorité des globules blancs circulants et leur nombre varie entre 1.8 et 7 milliards par litre. Une diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles circulants (neutropénie) expose à un risque infectieux, particulièrement grave en dessous de 500 millions par litre. Leur demi-vie dans le sang est brève (6 à 10 heures). Une migration rapide et massive des polynucléaires neutrophiles du sang circulant peut survenir en cas d'apparition d'un foyer inflammatoire où ces cellules exercent leur rôle puis meurent soit par nécrose soit par apoptose. En l'absence de stimulus inflammatoire, ils meurent spontanément par apoptose en moins de trois jours et peuvent être phagocytés par les macrophages, évitant ainsi la libération de leur contenu toxique. Une grande partie est également éliminée par l'intestin (GOUGEROT-POCIDALO *et al.*, 2002).

### 1.1. La maturation du neutrophile

Avant que le neutrophile puisse entreprendre une fonction précise, il doit passer à travers différentes étapes complexes de maturation. Durant le premier stade de différenciation cellulaire, le neutrophile est un hémoblaste granuleux qui se différencie en myéloblaste, ensuite en promyélocyte, en myélocyte, en métamyélocyte et finalement en cellule segmentée polymorphonucléaire, soit le neutrophile mature (BORREGAARD, 2010). Ce processus de maturation requiert environ 14 jours (BAINTON *et al.*, 1987) et ensuite les neutrophiles sont libérés dans la circulation sanguine. Ils possèdent un diamètre entre 7 et 10  $\mu\text{m}$  et un noyau segmenté.

Durant sa maturation, le neutrophile acquiert plusieurs compartiments intracellulaires (granules) qui entreposent, entre autre, les protéines nécessaires dans sa fonction de défense. Il existe quatre types de granules détaillé dans le tableau I qui sont formés consécutivement (HAGER *et al.*, 2010), soit les granules azurophiles (primaires) produits durant l'étape promyélocytaire, les granules spécifiques (secondaires) et les gélatinases (tertiaires) se forment durant l'étape myélocytaire et métamyélocytaire et finalement les vésicules sécrétoires sont créés durant la dernière étape, soit dans les cellules segmentées (BORREGAARD, 2010). Chaque type granulaire contient des protéines distinctes et est sécrété dans des conditions spécifiques (BARROWMAN *et al.*, 1987).

Les granules azurophiles représentent un tiers des granulations des PNs, contiennent majoritairement la myéloperoxydase (MPO), les défensines et l'élastase. Leur membranes contient le CD63, le CD68 et des pompes à protons ( $\text{H}^+$ -ATP ase) qui est derrière l'acidification de la matrice des granulations.

Les granules spécifiques sont des peroxydases négatives, contiennent la collagénase, l'histaminase et la lactoferrine. Leur membrane contient des récepteurs de facteurs chimioattractants comme le récepteur au peptide bactérien le FMLP, le cytochrome b558, sous unité catalytique de la Nicotine Amide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogénée (NADPH) oxydase (BAINTON, 1987).

Les granules gélatinases ou tertiaires permettent le stockage des métalloprotéases matricielles (MMPs) telles que la gélatinase (MMP-9), la collagénase (MMP-8) et contiennent également

des protéines membranaires notamment le récepteur du FMLP, le cytochrome b558, CD11b et CD18. Ces MMPs y sont stockées sous des formes inactives et subissent une activation protéolytique avant leur exocytose. Ces enzymes dégradent des composants de la matrice extracellulaire, comprenant le collagène, la fibronectine, les protéoglycanes, la laminine ainsi que la gélatine (KANG *et al.*, 2001).

Les vésicules sécrétoires contiennent également des protéines du plasma et des récepteurs membranaires impliqués dans l'activation du neutrophile. Les membranes de ces granules sont ainsi composées de  $\beta$ 2-intégrines (CD11b/CD18), de CR1, de récepteurs au formylmethionylleucylphenylalanine (fMLP), de CD14, de récepteur au fragment constant des IgG (Fc $\gamma$ III-R, CD16). Ces différentes protéines sont incorporées à la membrane des polynucléaires neutrophiles après exocytose (GREGOIRE, 2014).

**Tableau I** : Le contenu des granules des neutrophiles (FAURSCHOU *et al.*, 2003 ; GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO-NEDELEC, 2011).

Granulations azurophiles	Granulations spécifiques	Granulations gélatinases	Vésicules sécrétoires
<b>Protéines ancrées dans la membrane</b>			
V-type H <sup>+</sup> -ATPase CD63 CD68	CD11b/CD18 Cytochrome b558 fMLF-R CD66, CD67, CD15 TNF-R, IL10R, uPAR Fibronectine-R Laminine-R Thrombospondine-R Vitronectine-R SNAP23, VAMP2, stomatine Sous-unité a de protéine G SCAMP Rap1, Rap2	CD11b/CD18 Cytochrome b558 fMLF-R CD67 TNF-R, MMP25 SNAP23, VAMP2, Nramp1	CD11b/CD18 Cytochrome b558 fMLF-R CD67 CD35 MMP25 SNAP23, VAMP2 CD10, CD13, CD16 C1q-R Phosphatase alcaline
<b>Protéines liées à la matrice</b>			
Lysozyme Élastase Cathepsine G Protéinase 3 a-défensines BPI Sialidase Azurocidine b-glucuronidase MPO	Lysozyme Collagénase, gélatinase uPA, cystatine Cc, cystatineFc hCAP18, NGAL B12BP Lactoferrine Haptoglobine Pentraxine 3, prodéfensine Orosomucoïde Héparanase b2-microglobuline CRISP3	Lysozyme Gélatinase Arginase 1 b2-microglobuline CRISP3	Tétranectione

**Abbreviations**

ATPase : adenosine triphosphatase ; fMLF-R : formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanin receptor ; TNF-R : tumor necrosis factor receptor ; IL : interleukine ; uPAR : urokinase-type plasminogen activator receptor ; SNAP23 : synaptosome-associated protein of 23 kDa ; VAMP2 : vesicle-associated membrane protein 2 ; SCAMP : secretory carrier membrane proteins ; MMP : métalloprotéinomatricielle ; Nramp1 : natural resistance-associated macrophage protein one ; BPI : bactericidal/permeability increasing ; MPO : myéloperoxydase ; uPA : urinary plasminogen activator ; hCAP18 : human cathelicidin antimicrobial protein ; NGAL : neutrophil gelatinase-associated lipocalin ; B12BP : vitamin B12-binding protein ; CRISP3 : cysteinrich secretory protein 3.

### 1.3. Les propriétés du neutrophile

#### 1.3.1. Le chimiotactisme

La migration du neutrophile aux tissus endommagés est possible grâce à un gradient chimiotactique. Les chimioattractants peuvent être libérés par l'hôte via les cellules nécrotiques, stromales et épithéliales présentes à l'endroit de l'inflammation (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000). Les neutrophiles exposés aux chimioattractants subissent un changement morphologique et une modification de leurs compositions sécrétoires (GALKINA *et al.*, 2017). Des études ont démontré que le neutrophile priorise les chimioattractants en distinguant, à l'aide de voies de signalisation, les signaux faibles (LTB<sub>4</sub>, CXCL8, PAF), des forts (fMLP et C5a). Cette distinction lui permet d'éviter la distraction de signaux faibles dans un milieu possédant différents chimioattractants (HEIT *et al.*, 2002).

La chimiotaxie en présence de signaux faibles est contrôlée par l'activation des voies PI3K et PTEN (CANTLEY, 2002). En effet, PI3K phosphoryle PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub>, un messager secondaire très puissant amorçant la migration des neutrophiles (FUNAMATO *et al.*, 2002). Au contraire, en présence de chimioattractants forts, la migration du neutrophile passe par la voie signalétique des phospholipases A<sub>2</sub> et de la MAPK P38. La raison pour laquelle les neutrophiles sont soumis à une migration vers des chimioattractants forts plutôt que faibles provient du fait que l'activation de P38 qui reconvertit PIP<sub>3</sub> en PIP<sub>2</sub>, inhibe la voie PI3K par la localisation rapide de PTEN à la membrane plasmique (HEIT *et al.*, 2008). En présence d'un gradient chimiotactique, les neutrophiles peuvent migrer à une vitesse extrêmement rapide (ANDERSON *et al.*, 2000) leur permettant d'atteindre leur tissu cible en moins de trois heures. Cette rapidité les distingue des autres leucocytes qui eux peuvent prendre plus de trois heures avant d'être efficacement recrutés (CAPOCCIA *et al.*, 2008) (Figure 2).

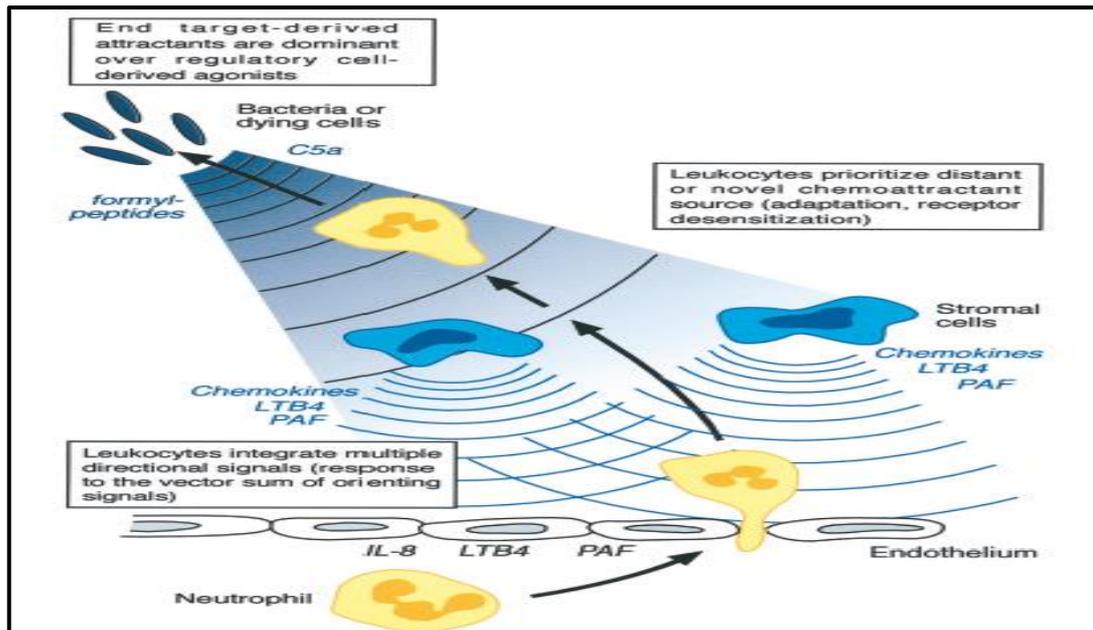


Figure 2 : Schéma la migration chimiotactique des leucocytes vers un site d'inflammation (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000).

### 1.3.2. L'adhérence et la migration

Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules à migrer du sang circulant vers un foyer inflammatoire (Figure 3). Sous l'influence de différents stimuli provenant du foyer inflammatoire, ils adhèrent aux cellules endothéliales des capillaires ou des veinules post-capillaires, se glissent entre celles-ci par diapédèse et se dirigent de façon orientée vers leur cible tissulaire. Cette migration dépend de molécules d'adhérence exprimées d'une part par les polynucléaires neutrophiles, et d'autre part par les cellules endothéliales. La première étape de cette migration fait intervenir une adhérence aux cellules endothéliales, réversible, par l'intermédiaire de molécules de la famille des sélectines, la L-sélectine (CD62L) à la surface des PN, les E- et P-sélectines (CD62E et CD62P) à la surface des cellules endothéliales, activées par des médiateurs provenant du foyer inflammatoire. Ceci induit un ralentissement du flux des polynucléaires et initie la phase dite de roulement à la surface de l'endothélium activé.

Les cellules endothéliales activées favorisent alors sur les PN la perte des L-sélectines et augmentent l'expression membranaire de  $\beta 2$  intégrines activées, en particulier CD11b/CD18. Les  $\beta 2$  intégrines activées se lient aux molécules d'adhérence ICAM (Intercellular Adhesion Molecules) exprimées à la surface des cellules endothéliales. Il y a alors une fixation non réversible qui consolide l'ancrage du PN et l'immobilise à l'endothélium

inflammatoire. Le résultat final de ces événements est le passage (diapédèse) des polynucléaires neutrophiles vers le foyer inflammatoire (GOUGEROT-POCIDALO *et al.*, 2002).

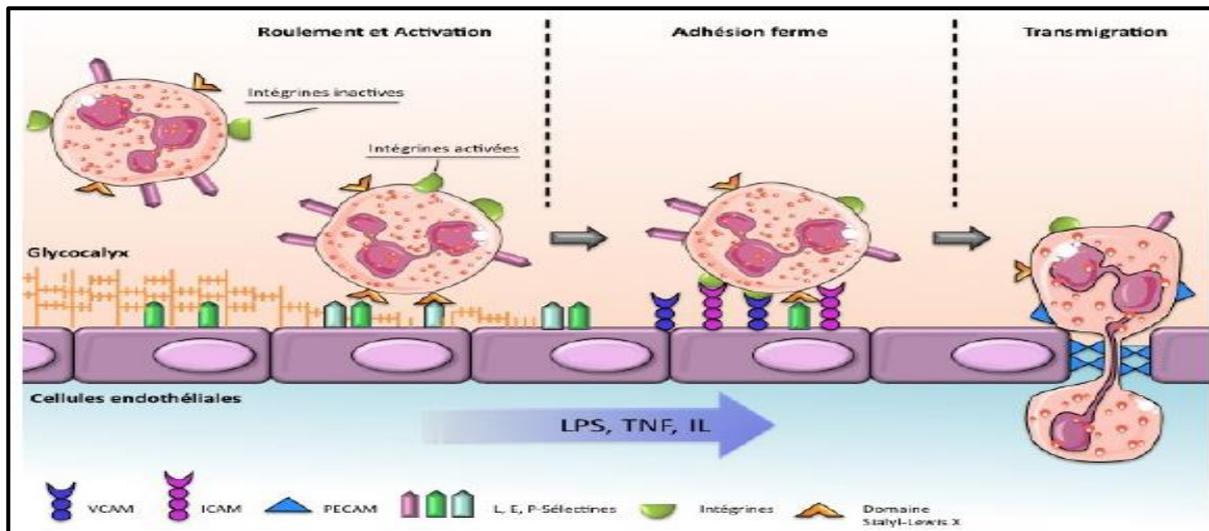
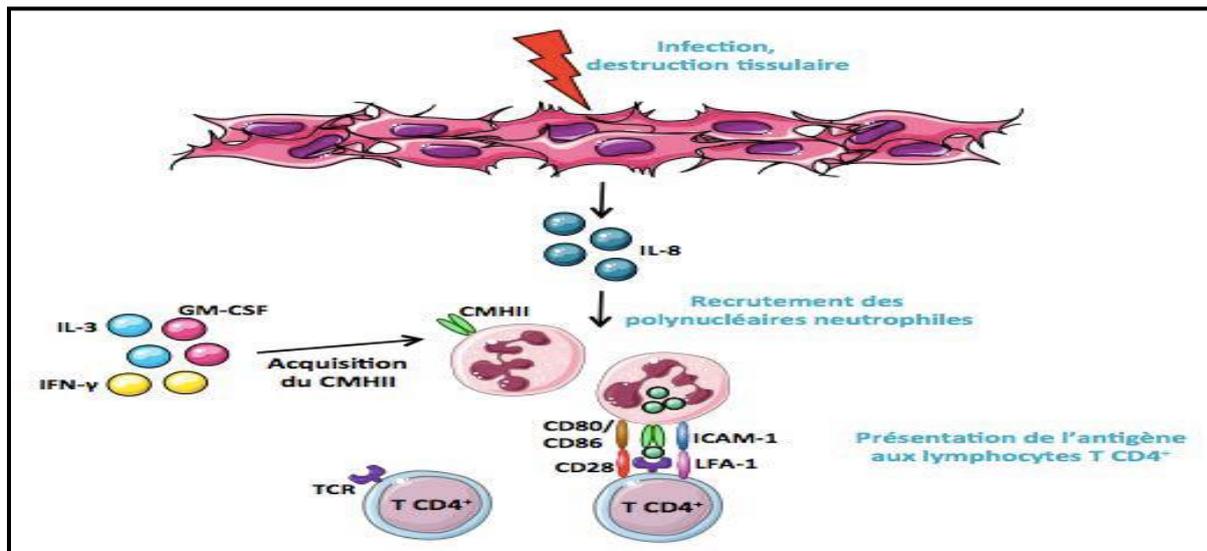


Figure 3 : Migration cellulaire du neutrophile(SATHIYANADAN *et al.*, 2014).

## 1.4. Les fonctions du neutrophile

### 1.4.1. La phagocytose et la présentation d'antigène

Les chimiokines et les cytokines libérées par les cellules au site inflammatoire activent fortement le neutrophile. Non seulement pour le conduire à détruire les micro-organismes, mais aussi pour le prédisposer à présenter un antigène comme le ferait une cellule présentatrice de l'antigène (CPA). La digestion complète d'un micro-organisme par le neutrophile se fait grâce aux lysosomes. Ainsi, le peptide progressivement apprêté sera transporter par les endosomes jusqu'à la membrane cellulaire et pouvoir s'associer aux molécules du CMH II. Ces dernières peuvent être rapidement transloquées à la membrane du neutrophile en présence d'anticorps anti-CD11b activant le récepteur CD18/CD11b lié à la phagocytose (CHAKRAVATI *et al.*, 2007). Une fois le complexe CMHII-Peptide antigénique est présenté, le neutrophile va l'exposer au TCRs des lymphocytes T CD4+, jouant un rôle direct dans l'induction de la réponse immunitaire adaptative(Figure 4). Récemment, il a été décrit que les polynucléaires neutrophiles ont la capacité de présenter les antigènes exogènes *via* le CMH I aux lymphocytes T naïfs CD8+ (BEAVILLAIN *et al.*, 2011).



**Figure 4 : Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la présentation des antigènes aux cellules de l'immunité adaptative : fonction de CPA (ASHTEKAR et SAHA, 2003).**

### 1.4.2. La bactéricidie

Les neutrophiles remplissent leur rôle de cellules effectrices principalement en internalisant (phagocytose) les agents pathogènes et les exposer à deux principes destructeurs de façon coopérative (figure 5) : les formes réactives de l'oxygène (FRO) générées par une enzyme appelée NADPH oxydase (la bactéricidie dépendante de l'oxygène) et les enzymes protéolytiques libérées lors de la dégranulation (bactéricidie non dépendante de l'oxygène) (ROOS *et al.*, 2003).

#### - Bactéricidie dépendante de l'oxygène

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique très puissant qui est capable de générer une quantité énorme de formes réactives de l'oxygène (FRO) lorsque les neutrophiles sont stimulés. Ce phénomène est appelé explosion oxydative du neutrophile. L'oxygène consommé par les neutrophiles est converti enzymatiquement en anions superoxydes ( $O_2^{\circ}$ ) en utilisant le NADPH cellulaire. Dans le phagolysosome, le superoxyde est converti spontanément ou enzymatiquement en  $H_2O_2$ , qui peut ensuite réagir avec le superoxyde pour générer les radicaux hydroxyles ( $OH^{\circ}$ ) et l'oxygène singulet (GOUGEROT-POCIDALOT *et al.*, 2011). Les granules azurophiles peuvent aussi participer à ce mécanisme oxydatif en libérant la myéloperoxydase (MPO) dans le phagolysosome pour générer l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) à partir de  $H_2O_2$  et l'ion chlorure. Un composé très toxique pour la majorité des microbes connu sous le nom d'eau

de Javel (SERTEYN *et al.*, 2003). Cependant, la production excessive ou inappropriée des FRO dans le milieu extracellulaire peut participer à la survenue de lésions tissulaires au niveau du site inflammatoire.

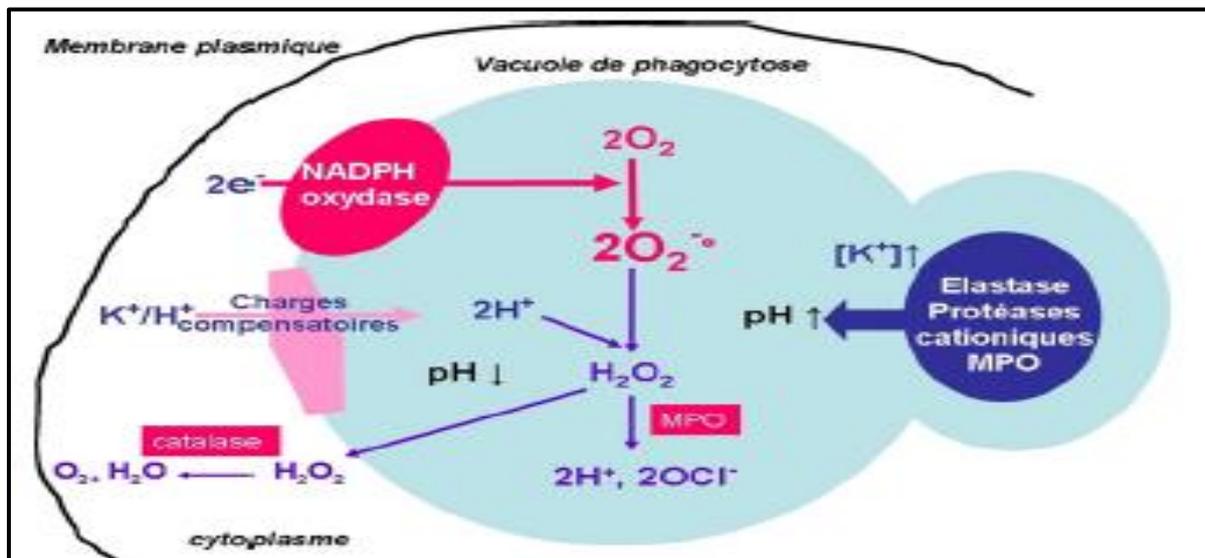


Figure 5: phagocytose et métabolisme oxydatif du neutrophile (STASIA *et al.*, 2009).

### -Bactéricidie non dépendante de l'oxygène

L'activation du neutrophile par les pathogènes induit la fusion des granules avec la membrane plasmique pour y libérer leurs contenus dans le milieu extracellulaire sous le phénomène de dégranulation. Ces granules contiennent une multitude de peptides antimicrobiens et de protéases constituant la microbicidie non oxydative des neutrophiles (Tableau II). Les défensines jouent un rôle sur la perméabilité membranaire des bactéries. Alternativement, il a été démontré que, chez *E. coli*, les  $\alpha$ - défensines inhibent la synthèse de l'ADN et l'ARN ainsi que les protéines. L'élastase dégrade la protéine A de la membrane externe et cible les facteurs de virulence des entérobactéries. Il a été démontré qu'en absence d'élastase, les bactéries s'échappent du phagolysosome menant à leur survie dans le cytoplasme des PN infectés (SOEHNLEIN, 2009). Les lactoferrine inhibent la prolifération bactérienne et les collagénases favorisent la migration du neutrophile vers les tissus par digestion du collagène (MICHAUD, 2009). L'importance des activités antimicrobiennes des différentes granules explique que les individus ayant des déficiences des enzymes oxydatives ne sont pas entièrement immunodéprimés (DUPONT, 2018).

**Tableau II : Principales protéines antimicrobiennes et leurs mécanismes d'action**  
(AMULIC *et al.*, 2012)

Les protéines antimicrobiennes	Mécanisme d'action
<b>Peptides et protéines cationiques</b>	
$\alpha$ -défensines	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perméabilisent la membrane contenant des phospholipides chargés négativement.</li> <li>- Inhibent la biosynthèse de l'ADN, ARN et des protéines.</li> <li>- Inhibent la synthèse de la paroi bactérienne</li> </ul>
Cathelicidines (LL-37)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forment des pores transmembranaires.</li> </ul>
BPIs	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorisent la perméabilité bactérienne et l'hydrolyse des phospholipides bactériens se fixant au LPS</li> </ul>
<b>Enzymes protéolytiques</b>	
Lysosymes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dégradent la paroi cellulaire bactérienne</li> </ul>
Elastases, Cathepsines G	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Clivent les facteurs de virulence bactériens et les protéines de membrane externe</li> </ul>
lactoferrines	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altèrent la croissance bactérienne en se liant au fer</li> </ul>
calprotectines	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altèrent la croissance bactérienne en se liant au manganèse et au Zinc</li> </ul>

**- La production de pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs)**

Les neutrophiles activés ont également la capacité d'éliminer les pathogènes par la production des NETs (neutrophil extracellular traps). Les NETs sont des filaments de chromatine décondensée, libérés dans l'espace extracellulaire, formés d'acide désoxyribonucléique (ADN) et d'histones, recouverts de nombreuses molécules bactéricides issues des granulations des PN (élastase). En effet, le maillage dense de chromatine permet la concentration des agents pathogènes, quel que soit leurs types. Ainsi, les enzymes et les histones permettent la destruction et l'inactivation de leurs facteurs de virulence (BARRIENTOS *et al.*, 2013).

**1.5. La régulation de l'activité du neutrophile**

La régulation des PN est essentielle pour éviter les dommages excessifs des tissus. Pour les PN, l'induction de leur apoptose induit l'arrêt de l'inflammation et le retour à l'homéostasie (DUUMAS et POULIOT, 2009). En effet, les PN ont une demi-vie courte qui pourrait être interprétée comme un mécanisme de contrôle strict du renouvellement et du nombre de PN dans l'organisme (GOUGEROT-POCIDALO., 2011).

L'apoptose des PNs peut être induite par deux voies distinctes. La voie intrinsèque implique la mitochondrie, les protéines de la famille B-cell leukemia protein-2 (Bcl-2), ainsi que les caspases. Le relargage du cytochrome-c de la mitochondrie dans le cytoplasme induit l'activation de la caspase-3, l'une des protéases effectrices majeure de l'apoptose. De plus, lors de l'apoptose, les taux des protéines de survie Mcl-1 et Bcl-2-related protein A1 (Bcl2-A1) diminuent en raison de leur dégradation par le protéasome (MOULDING *et al.*, 2001). Alors que, la voie extrinsèque d'apoptose, met en jeu des récepteurs de mort retrouvés à la surface des PNs tels que le récepteur Fas et le récepteur TNFR (tumor necrosis factor receptor). La liaison des ligands spécifiques à ces récepteurs de mort provoque l'activation de la cascade des caspases aboutissant à l'apoptose des PNs (SIMON, 2003). Finalement, les PNs apoptotiques sont reconnus et phagocytés par les macrophages résidents.

*Phlomis bovei*

## 2. *Phlomis bovei*

### 2.1. La présentation de *Phlomis bovei*

Selon QUEZEL et SANTA (1963), les Lamiacées constituent une famille très importante dans la flore algérienne. Ils sont représentés par 28 genres et 146 espèces contre 8 genres et 12 espèces décrites par OZENDA (1991) dans tout le Sahara. Le genre *Phlomis* est une herbe vivace qui comprend plus de 100 espèces distribuées en Afrique, en Asie et 12 espèces en Europe (KATAYOUNET *et al.*, 2004). En Algérie, il existe 4 espèces : *Phlomis herba-ventiet* trois espèces endémiques : *Phlomis bovei*, *P. caballeroi* et *P. crinita* (ALBALADEJO *et al.*, 2005). Le nom *Phlomis* vient du grec « phlox » qui signifie flamme car les feuilles de ces plantes servaient à la fabrication des mèches de bougies.

#### 2.1.1. La classification et la description botanique

La principale classification botanique de l'espèce *Phlomis bovei* est celle de CANTINO (1992), présentée dans le tableau III.

**Tableau III** : Classification botanique de *Phlomis bovei* (CANTINO *et al.*, 1992).

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous-classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiaceae
<b>Genre</b>	<i>Phlomis</i>
<b>Espèce</b>	<i>Phlomis bovei</i>

*Phlomis bovei* est une plante endémique algérienne rare. C'est l'une des neuf plantes endémiques enregistrées dans le rapport National sur la diversité biologique en Algérie (ZAABAT, 2010). Cette plante est plus connue sous le nom de « *Phlomis samia* » et en arabe sous celui de « *Khaytt el adjarah* ». C'est une plante herbacée, généralement très velues, à feuilles opposées simples et ridées. Les fleurs, jaunes, roses, blanches, violacées ou pourprées, sont groupées en verticilles plus ou moins denses répandues dans les côtés tempérés de l'Asie, de la Chine et dans la région méditerranéenne (Figure 6).



**Figure 6:** Présentation des parties aériennes de *Phlomis bovei*.

## 2.2. La composition phytochimique

Une des propriétés typiques du genre *Phlomis* est sa richesse en différentes classes de composés naturels, 151 composés ont été isolés jusqu'à présent. On y trouve :

### -Les diterpènes

Jusqu'à présent 12 diterpènes ont été cités dans le genre *Phlomis* dont 8 labdanes, 2 diterpènes glycosyles, un kaurane et un pimarane (LI *et al.*, 2010).

### -Les phénylpropanoïdes et les phényléthanoïdes

Les phényléthanoïdes sont un caractère taxonomique important du genre *Phlomis*. L'actéoside est le composé le plus isolé qui se trouve dans 14 espèces.

### -Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe des composés phénoliques de plantes avec des propriétés antioxydantes et chélatantes, du fait de leur capacité à chélater les métaux tels que le fer et l'aluminium (HEIM *et al.*, 2002 ; HAENEN *et al.*, 2006). Les flavonoïdes sont connus pour leurs nombreuses activités biologiques attribuées en partie, à leur capacité de piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH•) et les superoxydes (O<sub>2</sub>•-). Plus de quarante flavonoïdes ont été identifiés dans le genre *Phlomis* (KABOUCHE *et al.*, 2005). La majorité des flavonoïdes identifiés dans ce genre sont de type flavones, flavonoles et leurs dérivés : 7- ou 3-O-glycosyles. Les composés les plus isolés sont la luteolin-7-O-β-glucopyranoside, le chrysoeriol-7-p-coumarylglucoside et chrysoeriol-7-O-glucoside. Il y a

également des flavones C-glycoside comme la vicenine-2 et les flavonones comme la naringenine et l'eriodytyol. On rencontre aussi de nombreux autres métabolites secondaires tels que : glycoside acétophenone, acridone alcaloïde, l'alcool aliphatique glycoside, alcool benzylique glycoside, acide caféique esters, lignane, glucoside megastigmane, glycoside monoterpène, glucoside néolignane, les phenylpropanoïdes et les phenylethanoïdes (ZHANG et WANG, 2008).

Le tableau IV récapitule les différents composés secondaires rencontrés dans l'espèce *Phlomis bovei*.

**Tableau IV :** Composés chimiques rencontrés dans l'espèce *Phlomis bovei* (LIMEM-BEN AMOR *et al.*, 2009).

Groupes chimiques	Composés polyphénoliques
<b>Flavonoïdes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-chrysoeriol 7-O-(3''-(E et Z)-p-coumaroyl)- <math>\beta</math>-glucopyranoside.</li> <li>-apigenine-7-O-glucoside.</li> <li>- apigenine-7-O-[6''-E-p-O-coumaryl] <math>\beta</math>-D-glucopyranoside(3''-coumaryl) glucopyranoside.</li> <li>-hispiduline-7-O-glucuronide.</li> <li>-apigenine-7-O-(6''-(5''-methoxy-coumaryl)-glucoside.</li> </ul>
<b>Phenylethanoïd glycosides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Acteoside.</li> <li>-Samioside (1-O-3,4-(dihydroxyphenyl) ethyl <math>\beta</math>-D- apiofuranosyl (1<math>\rightarrow</math>4)-<math>\alpha</math>-L-rhamnopyranosyl-(1<math>\rightarrow</math>3)-4-O-caffeoyl-<math>\beta</math>-D-glucopyranoside).</li> </ul>

### 2.3. Usages traditionnels et effets biologiques

La plante entière de *phlomis bovei* est utilisée dans la région méditerranéenne en médecine traditionnelle comme un anti-inflammatoire. Elle se caractérise par une diversité quantitative et qualitative dans sa composition en polyphénols ce qui donne à la plante un potentiel antioxydant majeur. En Algérie, elle est utilisée en tant que colle cicatrisante pour traiter les brûlures, lésions, infections de peau et allergies (LIOLIOS *et al.*, 2007). En Turquie, cette plante est utilisée comme stimulant, tonifiant, remède contre les désordres gastriques (douleurs d'estomac et ulcères peptiques) et comme cicatrisant (YESILADA *et al.*, 2002).

Les propriétés curatives de cette espèce, sont aussi appréciées en Inde où elle est en particulier utilisée comme insecticide. Certaines espèces du genre *Phlomis* sont utilisées comme stimulants, toniques, antalgiques, antidiabétiques, antipyrétiques, anti-diarrhéiques, antiallergiques, antiulcéreux et anti-hémorroïdaires. Quelques études pharmacologiques et biologiques ont été réalisées sur le genre *Phlomis* dont certaines ont montré ; en plus des activités anti-inflammatoires et antioxydantes ; des activités anti-nociceptives, immunosuppressives, antimutagènes et antimicrobiennes (LI *et al.*, 2010).

**Partie**  
**Expérimentale**

## 1. Matériel et méthodes

Le stage pratique a été effectué au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie (LABAB) au sein de l'université Mouloud Mammeri à Tizi-Ouzou.

### 1.1. Matériels

#### Appareils :

- Agitateur magnétique ;
- Bain marie ;
- Balance analytique ;
- Centrifugeuse ;
- Hotte ;
- Incubateur.
- Lyophilisateur ;
- Microscope photonique ;
- Microscope inversé ;
- pH mètre ;
- spectrophotomètre.

#### Produits chimiques et réactifs :

- Acétate de potassium (1M) ;
- Acide gallique ; BSA ;
- Carbonate de sodium (4% m/v).
- Colorants (Bleu de Trypan ; Bleu de Méthylène ; Cristal violet) ;
- Dextran T500 à 2% ;
- Ethanol 99.8% ;
- Ficoll ; PMA ; DMSO
- NaCl 0.9%, NaCl 0.2% et NaCl 1.8% ;
- PBS (NaCl ; KCl ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ;
- Quercetine ; Réactif de Folin-Ciocalteu (10% v/v) ;
- Solution A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydre 2% dans NaOH, 0.1M) ; solution B (CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0.5%, tartrate de Na et K, 1% ;

#### Matériel biologiques :

- Sang frais humain prélevé sur EDTA.
- Extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* lyophilisé.

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Isolement et dénombrement des polynucléaires neutrophiles

#### -Principe

Les polynucléaires neutrophiles(PNs) sont séparés des autres cellules sanguines par la technique classique Dextran/ Ficoll, basée sur le principe de sédimentation par gradient de densité et par centrifugation (El-BENNA et DANG, 2007).

#### -Protocole expérimentale

Les prélèvements sanguins se font à partir de donneurs sains et recueillis dans des tubes EDTA pour éviter la coagulation. Les différentes étapes d'isolement des PN sont présentées dans la (Figure 7).

Dans un tube à 50 ml, un volume de Dextran T500 à 2% (préparé dans du NaCl 0.9% et filtré) est ajouté à un volume de sang et laissé à température ambiante pendant 30 min qui est le temps correspondant à la vitesse moyenne de sédimentation des hématies.

Après l'élimination des hématies, le surnageant riche en leucocytes contaminé de ces dernières a été centrifugé à 400g à 22°C pendant 8 min.

Le culot récupéré est resuspendu dans du PBS (volume 2/3) (2.68 mM KCl, 0.14 M NaCl, 1.21 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 8.10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) et déposé sur un coussin du ficoll (volume 1/3) suivi d'une centrifugation à 400g à 22°C pendant 30 min.

Après cette étape, trois phases se distinguent, le culot correspond aux granulocytes (éosinophiles, neutrophiles et basophiles) avec les érythrocytes contaminants, le surnageant correspond à un mélange de plasma, tampon phosphate et le ficoll, l'anneau entre le culot et le surnageant correspond aux cellules mononucléées (monocytes et lymphocytes).

Pour lyser les érythrocytes contaminants le culot, un volume de la solution hypotonique NaCl 0.2% froide est ajouté au culot pendant 30 secondes. Pour établir l'isotonie, un volume de la solution hypertonique NaCl 1.8% est additionné. La solution est tamponnée par l'ajout de tampon phosphate suivie d'une centrifugation à 400g à 4°C pendant 8 min.

Les neutrophiles récupérés dans le culot sont mis en suspension dans la même solution et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

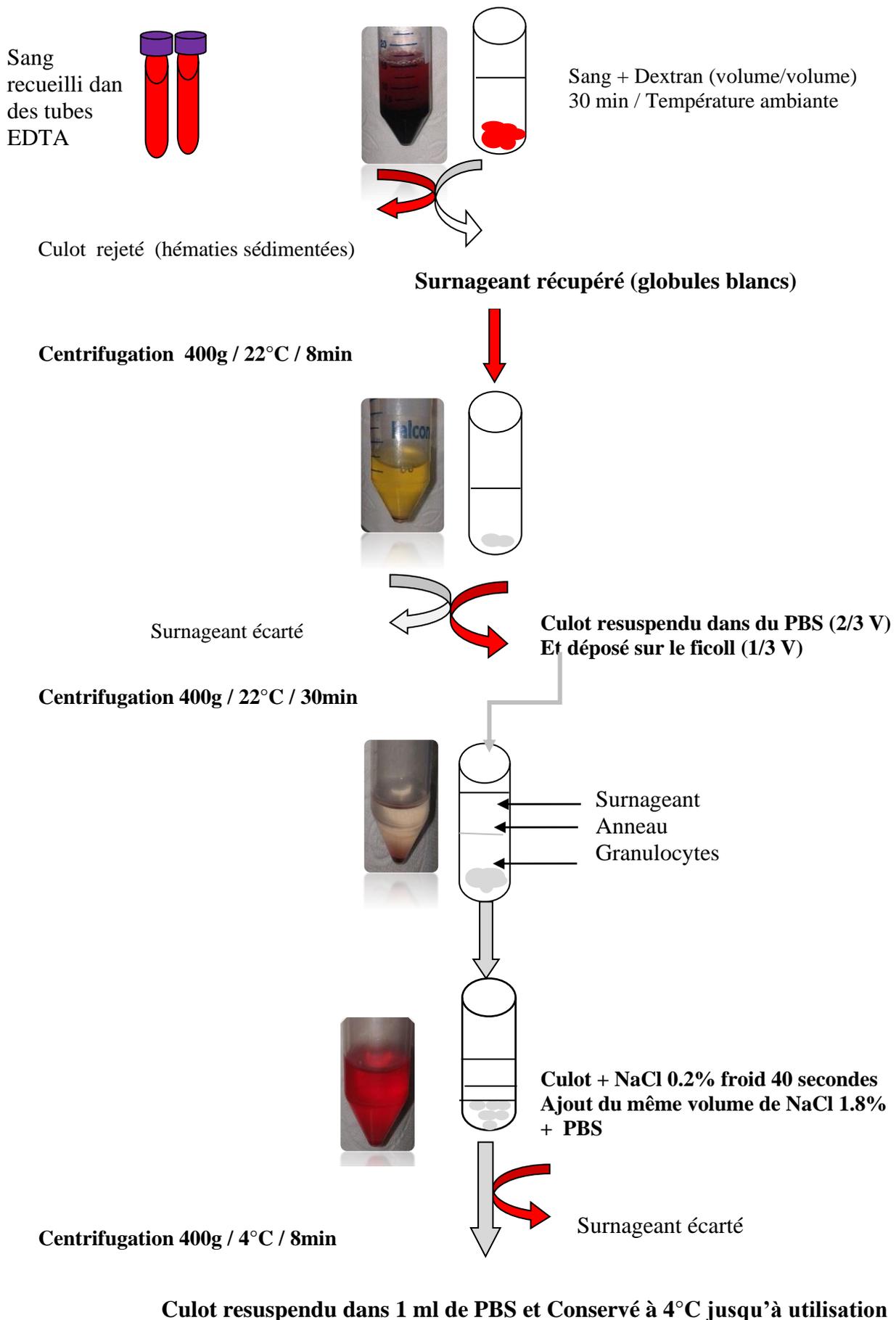


Figure 7 : Protocole expérimental d'isolement du neutrophile humain à partir du sang frais selon El-BENNA et DANG, 2007, adapté.

### 1.2.2. Dénombrement des neutrophiles

Le comptage ou numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide. Il est réalisé par la dilution d'un volume de PN's dans un tampon phosphate qui est mélangé par la suite à une solution de Cristal violet ou au bleu de trypan qui permet l'identification des cellules. Ce mélange est déposé sur une lame de malassez afin de faire le comptage au microscope photonique (Figure 8). La viabilité des cellules est testée par l'utilisation d'une solution de bleu de trypan ou de bleu de méthylène qui doit être filtré sur un filtre 0,22 µm pour éliminer les précipités. Ces derniers colorent les cellules mortes en bleu foncé, car ils pénètrent dans leur cytoplasme et dont la membrane plasmique est devenue perméable, les cellules vivantes restent intactes suite à l'exclusion du bleu de trypan ou du bleu de méthylène hors du cytoplasme. Cette opération s'effectue le long de trois lignes pour obtenir une moyenne et appliquer la formule suivante :

$$N = n \times 10 (\text{nombre de lignes de la cellule de malassez}) \times 1000 (\text{ml}) \times F \times V$$

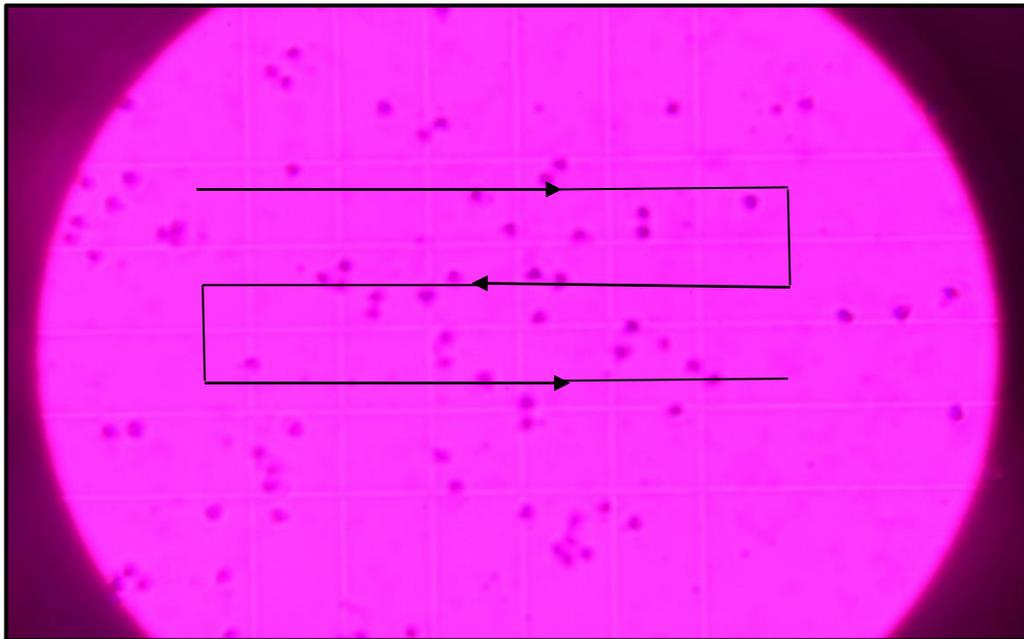
Dont :

**N** est le nombre total des PN's ;

**n** est la moyenne des trois lectures ;

**V** est le volume total des PN's préparés ;

**F** est le facteur de dilution.



**Figure 8: Dénombrement des neutrophiles sur une cellule de malassez**

### 1.2.3. Préparation et caractérisation de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei*

#### 1.2.3.1. Préparation de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei*

Les feuilles de cette plante ont été séchées à l'aire libre et à l'abri de la lumière, puis réduites en poudre pour subir le processus de macération à froid dans de l'eau distillée (10g de la poudre végétale dans 100ml d'eau distillée pendant 24 heures à l'abri de la lumière). Le macérat obtenu subit une filtration grossière à l'aide d'une passoire suivit d'une seconde filtration avec le papier Whatman N°1. Le filtrat récupéré est reparti dans des cristallisoirs qui sont recouverts avec du papier film et maintenus au congélateur à -80°C pendant 24 heures pour être l'objet d'une lyophilisation au final.

Le lyophilisat obtenu constitue l'extrait aqueux qui est, avant chaque utilisation solubilisé dans un tampon phosphate pour une concentration finale de 10mg/ml.

#### **-Calcul du rendement**

Le pourcentage en extrait brut a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M/M_0 \times 100$$

**R** : Rendement exprimé en %

**M** : Masse en gramme de l'extrait sec résultant

**M<sub>0</sub>**: Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

### 1.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes dans l'extrait aqueux de *Phlomis boveia* été effectuée suivant la méthode colorimétrique adaptée par COSTA *et al.*, 2016.

1.5 ml de l'éthanol, 0,1 ml d'acétate de potassium (1 M) et 2,8 ml d'eau distillée ont été ajoutés à 0,5 ml de l'extrait solubilisé dans l'éthanol (1 mg/ml). Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 425 nm et les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide quercétine par gramme d'extrait sec de la plante. La figure 9 résume les principales étapes du dosage des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de la quercétine utilisé comme standard (Figure 10).

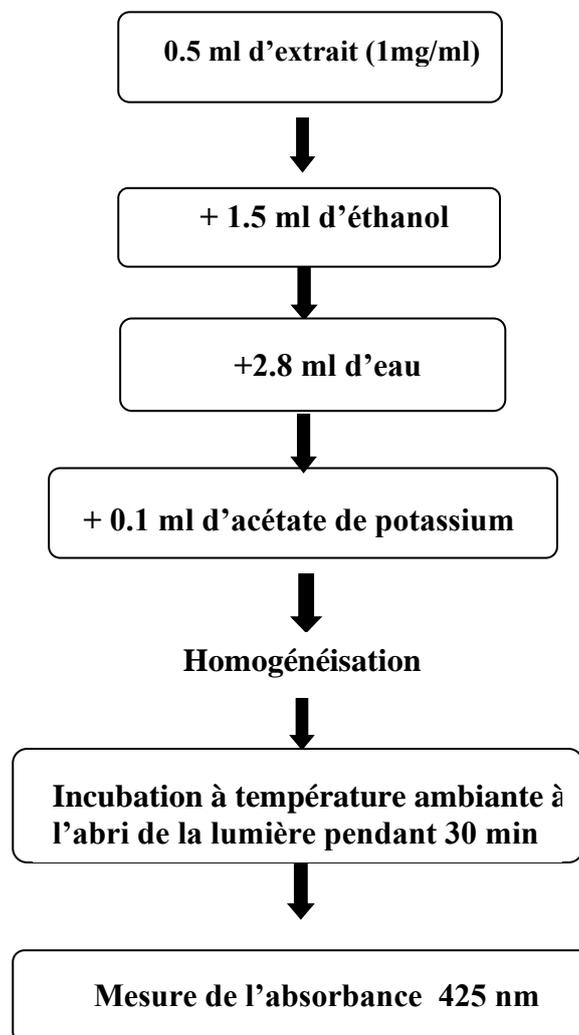
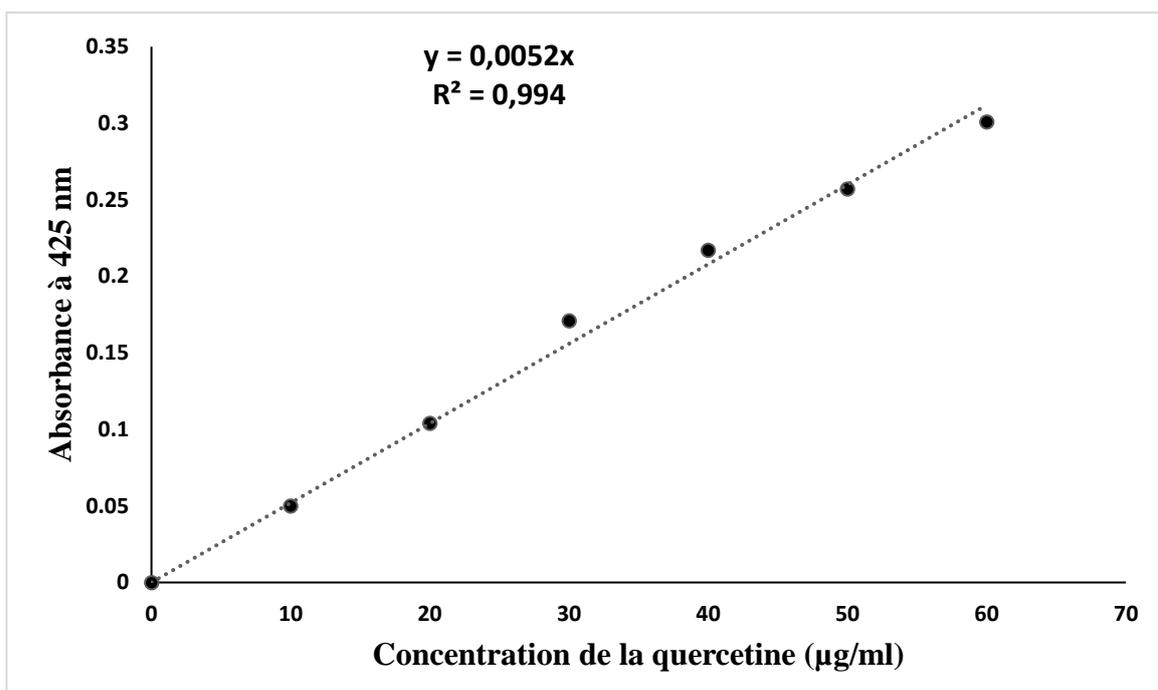


Figure9 : Protocole de dosage des flavonoïdes (COSTA *et al.*, 2016).



**Figure10 : Courbe de dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine comme standard.**

### 1.2.3.3. Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols est effectuée en suivant la méthode de Folin-Ciocalteu selon COSTA *et al.*, 2016.

2,5 ml de Folin-Ciocalteu 10 % (v/v) et 2 ml de carbonate de sodium 4 % (m/v) ont été ajoutés à 0,5 ml d'extrait dans l'éthanol (1 mg/ml). Après une incubation de 2 h dans l'obscurité, à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 750 nm et les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait.

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le milieu réactionnel (SAMYDURAI *et al.*, 2012). La figure 11 résume les principales étapes du dosage des polyphénols. La concentration en composés phénoliques est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide gallique utilisé comme standard (Figure 12).

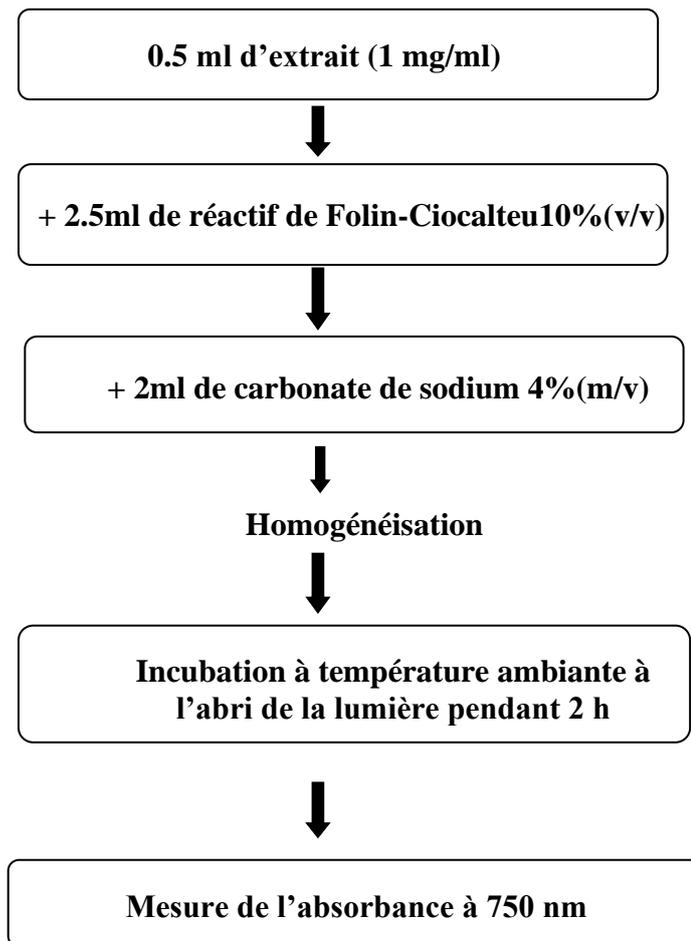


Figure 11: Protocole de dosage des polyphénols (COSTA et al., 2016).

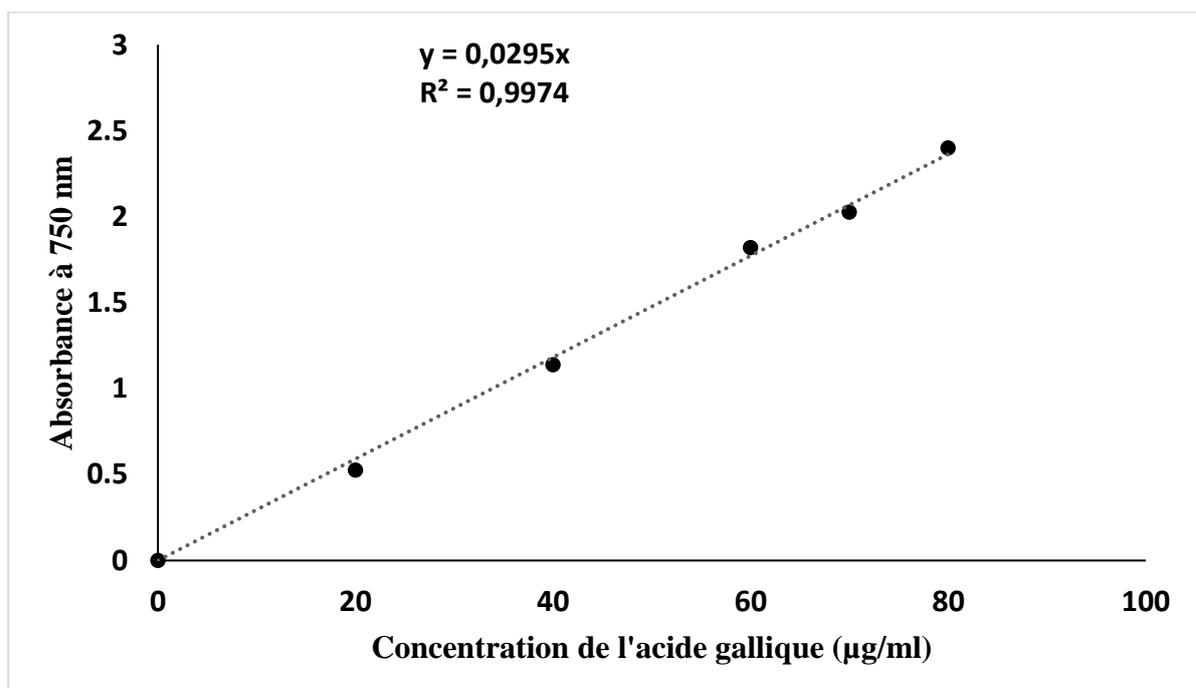


Figure 12: Courbe de dosage des polyphénols en utilisant l'acide gallique comme standard.

#### 1.2.4. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei*

Pour déterminer l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* sur les PNs, nous avons préparé une série de solutions contenant : un volume de cellules équivalent à 1 million, un volume de l'extrait préparé à 10 mg/ml correspondant aux dilutions souhaitées [0, 25, 50, 100, 200] et un volume de PBS pour avoir au final un volume total de 1000 $\mu$ l. Les cellules mélangées à différentes concentrations de l'extrait sont ensuite incubées à 37°C pendant une heure de temps. L'effet cytotoxique est évalué en dénombrant sous microscope photonique au grossissement 40 les cellules mortes colorées au bleu de méthylène ou au bleu de trypan se trouvant dans un champ de 100 cellules.

#### 1.2.5. Evaluation de l'effet de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* sur l'adhérence

Pour déterminer l'effet de l'extrait de feuilles de *Phlomis bovei* sur l'adhérence des PNs, nous avons préparé les mêmes solutions que le test précédent, puis incubées pendant une heure à 37°C. Après cette étape d'incubation, nous avons déposé les échantillons dans des boîtes de pétri en polypropylène moins collant pour les cellules de 3,5 cm de diamètre (Figure 13). Ces boîtes sont ensuite incubées pendant 15 min à 37°C. Une fois l'incubation est terminée, le surnageant est aspiré afin d'évaluer l'effet sur l'adhérence en dénombrant les cellules vivantes par la méthode de coloration au cristal violet sous microscope photonique et observer les cellules adhérentes colorées au cristal violet ou au bleu de trypan sur les boîtes sous microscopes inversé.

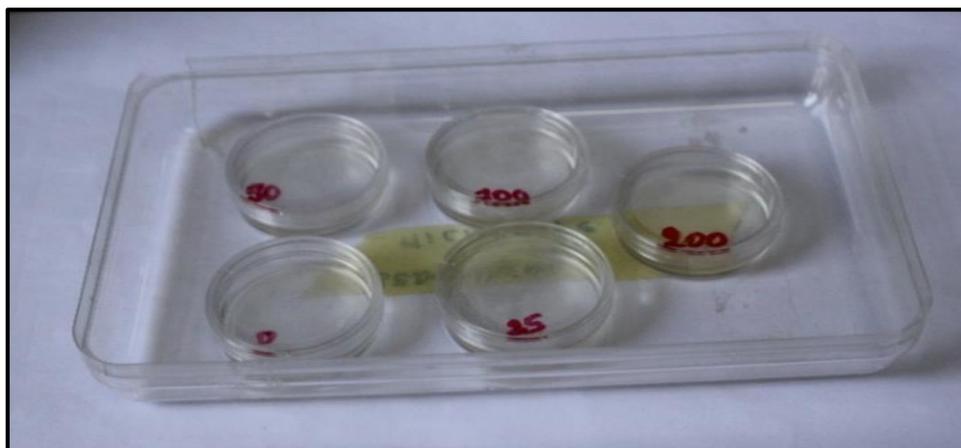


Figure 13: Photos du test d'adhérence sur boîtes de pétrie.

### 1.2.6. Evaluation de l'effet de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis boveis* sur la dégranulation des Polynucléaires neutrophiles

#### A. Dégranulation des PN

L'expulsion des protéases, enzymes catalytiques et récepteurs contenus dans les granules des neutrophiles est primordiale pour l'élaboration de différentes fonctions des neutrophiles stimulés par les chimioattractants (PMA). La dégranulation des neutrophiles peut être induite dans les conditions *in vitro*. Les cellules ont été pré-incubées pendant 15 min en présence de l'extrait à des concentrations croissantes (BEDOUHENE *et al.*, 2017) suivies d'une autre incubation pendant 2h 30min à 37°C en présence de phorbolmyristate acétate (PMA) à 100 nM afin de les stimuler et induire leur dégranulation (COSTA *et al.*, 2016).

La réaction est arrêtée par centrifugation à 13000 tr /30 secondes pour récupérer le surnageant contenant la myéloperoxydase et d'autres protéines de dégranulation et le culot contenant les PN sédimentés.

#### B. Mesure de l'activité de la myéloperoxydase

La myéloperoxydase est une enzyme clé des PN stockées en grande quantité dans les granules azurophiles. Elle est considérée comme une enzyme fascinante, multifonctionnelle et stimulante capable de catalyser une large gamme de substrats en contribuant à l'induction de l'apoptose dans les PN et à d'autres cellules et, ainsi, à l'interruption de la réponse inflammatoire (ARNHOLD et FLEMMIG, 2010). L'activité de la myéloperoxydase est mesurée par la méthode spectrophotométrique décrite par BRADLEY *et al* (1982) modifiée. Cette méthode est basée sur l'oxydation du réactif utilisé l'orthodianizidine (3,3'-Diméthoxybenzidine) en présence du peroxyde d'hydrogène qui se traduit par une coloration orange.

Le milieu réactionnel est constitué de 50µl d'orthodianizidine (2mg/2ml), 50µl du peroxyde d'hydrogène dilué à 1/1000, 350µl du tampon phosphate et 50µl du surnageant récupéré pour avoir un volume total de 500µl. L'absorbance est mesurée à 460 nm pendant 10 min à température ambiante (BEDOUHENE *et al.*, 2017).

### C. Dosage des protéines totales

Il est souvent nécessaire de connaître la concentration totale de l'ensemble des protéines présentes dans le surnageant. Pour cela, la méthode de quantification utilisée est la méthode colorimétrique de LOWRY *et al* (1951) en utilisant le Folin-Ciocalteu comme réactif.

Le réactif de Folin-Ciocalteu (acide phospho-tungsto-molybdique) est plus ou moins réduit par les protéines (les groupements oxydés des acides aminés), notamment les groupements phénoliques du tryptophane et de la tyrosine et, dans une moindre mesure, ceux de la cystéine et de l'histidine (la liaison peptidique est aussi impliquée). Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : le bleu de molybdène dont l'intensité peut être mesurée au spectrophotomètre à 750 nm. Pour effectuer ce dosage, on a préparé deux solutions : La solution A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhydre à 2% dilué dans NaOH à 0.1 M ; La solution B (2 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 0.5% + 2 ml de tartrate de Na et K à 1 %). Ces deux solutions ont été mélangées pour avoir la solution C (50ml A + 1ml B).

A 100 $\mu\text{l}$  d'échantillon à des concentrations croissantes allant de 0 à 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 400 $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 2.5 ml de la solution C ont été ajoutées et préincubées pendant 10 min. Après 30 minutes d'incubation en présence de 250 $\mu\text{l}$  du réactif du Folin-Ciocalteu à l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 750 nm. Les résultats ont été exprimés en utilisant la courbe d'étalonnage de BSA comme un standard (Figure 14).

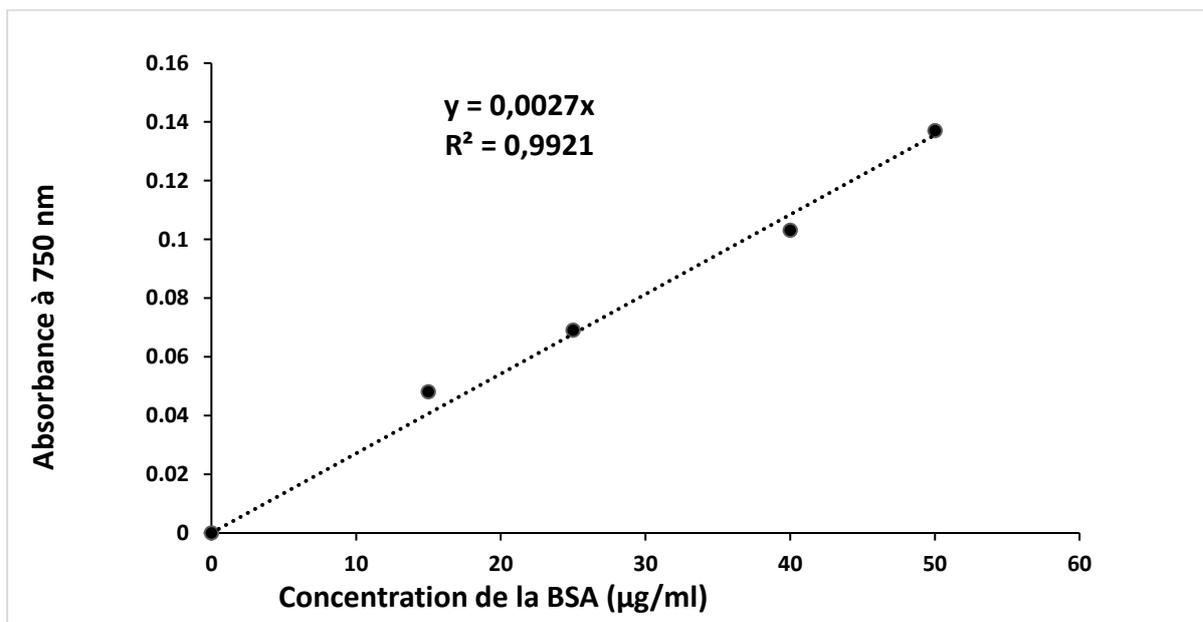


Figure 14 : courbe d'étalonnage de la BSA.

### **Analyse statistique**

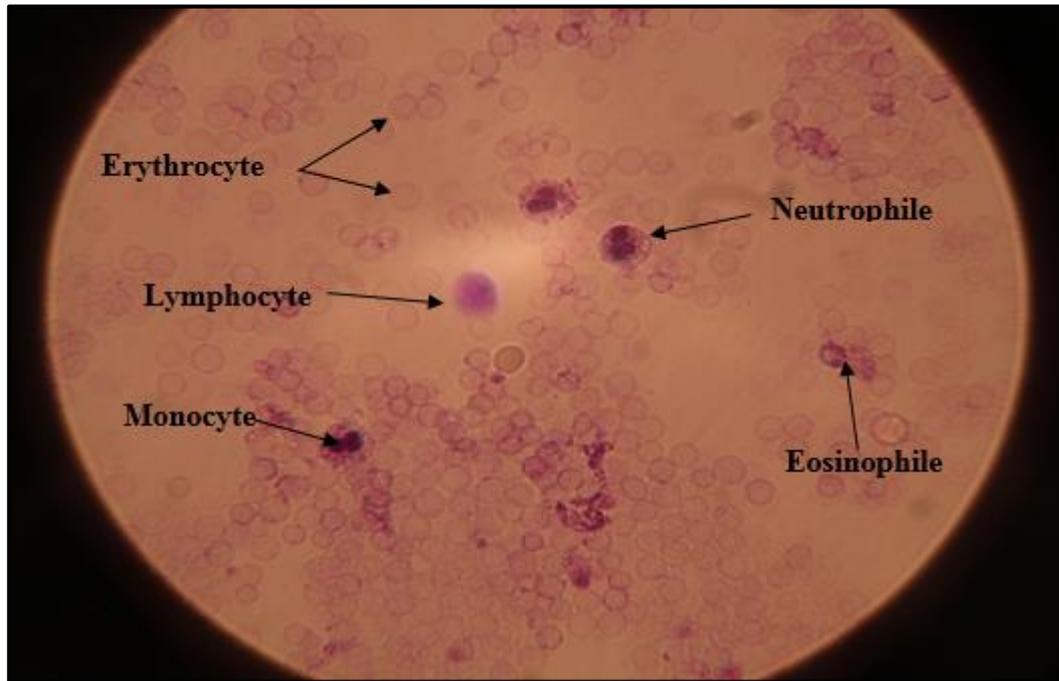
Les moyennes et les écartypes sont calculés avec Excel de Microsoft Office 2013. Les résultats des tests de viabilité, d'adhérence et de dégranulation ont fait l'objet d'une analyse statistique. Les variations sont considérées comme significatives si la valeur de P est inférieure ou égale à 0,05.

## **Résultats et discussion**

## 1. Résultats et discussion

### 1.1. Isolement et dénombrement des neutrophiles

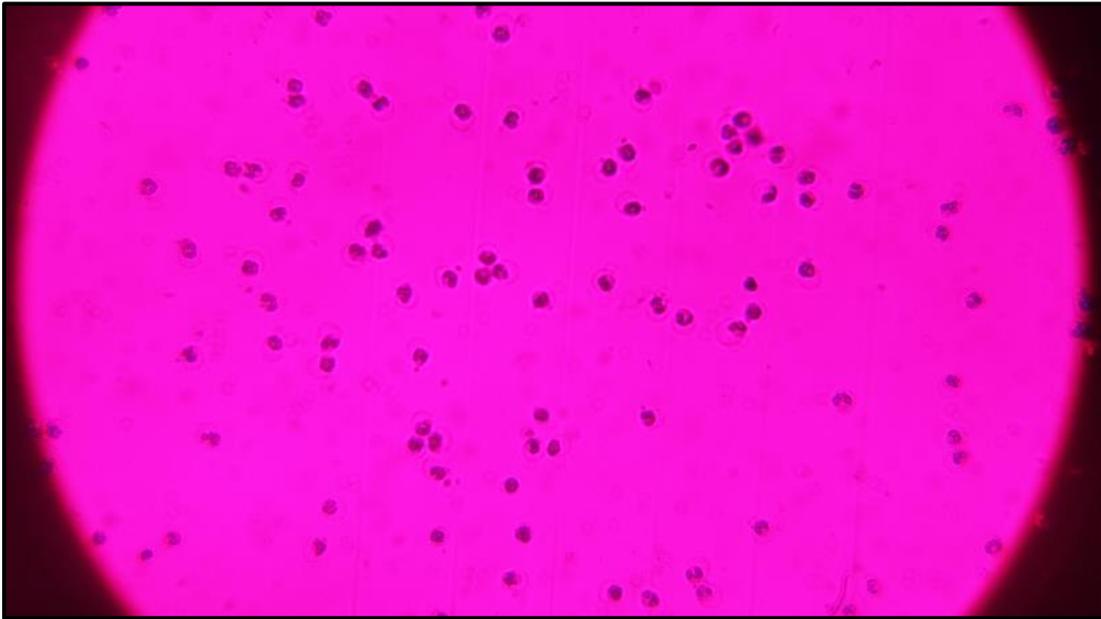
L'étape d'isolement des PNs est précédée par la réalisation d'un frottis sanguin afin d'observer les différentes composantes du sang total sous microscope photonique. Ces dernières sont représentées dans la figure 15.



**Figure 15: Observation des cellules sanguines en microscopie photonique au G x 100.**

Après chaque isolement nous effectuons un comptage afin d'évaluer la viabilité et la pureté des cellules. Pour cela les neutrophiles sont dilués au cristal violet qui permet de visualiser les noyaux sous microscope photonique (la figure 16).

Cette méthode de comptage est simple et relativement reproductible, il y a seulement une variabilité dans le nombre de cellules en fonction du donneur.



**Figure 16 : Observation de neutrophiles en microscopie photonique au G x 40.**

## 1.2. Préparation et caractérisation de l'extrait

Le rendement en extrait aqueux est de l'ordre de 4.8% par rapport au poids initial de l'extrait des feuilles séchées de *Phlomis bovei*.

### 1.2.1. Teneur des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait testé à une concentration fixe (1mg/ml) est déterminée en suivant la méthode de COSTA (2016). La concentration est déterminée en équivalent de quercétine en utilisant une courbe d'étalonnage (figure 10).

Les résultats obtenus montrent que le taux de flavonoïdes est très faible dans l'extrait aqueux par rapport aux résultats trouvés par SAADOUN *et al.*, 2018, il est de l'ordre de  $25 \pm 2.3$  mg EQ / g d'extrait. Il est presque deux fois inférieur à celui relevé dans l'extrait éthanolique de la plante *Mentha* appartenant à la même famille que *Phlomis bovei* qui est de l'ordre de  $63 \pm 2.29$  mg EQ/g. Ce résultat reste toujours inférieur à celui obtenu par l'extraction dans du chloroforme qui est de  $121 \pm 0.35$  mg EQ/g.

Ces résultats montrent que les extraits éthanoliques et les extraits chloroformiques sont plus riches en flavonoïdes que les extraits aqueux. Cela est dû à la différence de méthodes d'extraction et aux propriétés physico-chimiques des solvants d'extractions utilisés.

En effet, la concentration des flavonoïdes dans les extraits de plantes dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation d'extrait (GHEDADBA *et al.*, 2015). Il a été prouvé également que les teneurs en flavonoïdes sont plus élevées lorsque la plante est en état de stress, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et de survivre (HAMMOUDI, 2015).

### 1.2.2. Teneur des polyphénols

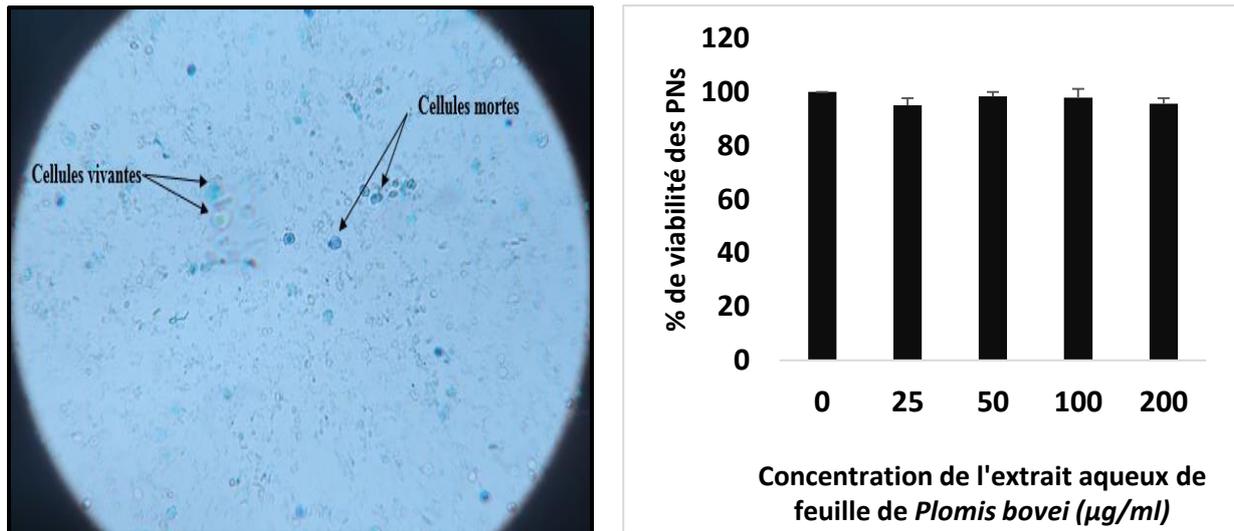
Des dosages spectrophotométriques ont été effectués à partir de l'extrait brut aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* (1mg/ml) afin de déterminer la teneur en polyphénols à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 12). La teneur en polyphénols totaux dans l'extrait est déterminée par le test du Folin-Ciocalteu suivant la méthode de COSTA (2016). Elle est de  $56 \pm 4$  mg EAG/g d'extrait.

La concentration des polyphénols dans l'extrait aqueux de *Phlomis bovei* que nous avons obtenu est très faible par rapport aux résultats obtenus par SAADOUN *et al.*, 2018 dans l'extrait éthanolique de la plante *Mentha* avec un taux de  $196 \pm 3,53$  mg EAG/g. Ce résultat montre également des teneurs plus faibles en polyphénols par rapport aux valeurs déterminées par SAADOUN *et al.*, 2018 dans l'extrait chloroformique de la plante *Mentha* avec un taux de  $213 \pm 3,06$  mg EAG/g.

Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs dont la méthode et le système d'extraction, sachant que le rendement pour l'extraction aqueuse est souvent faible. Il faut rajouter à cela l'origine géographique, le degré de maturité et les conditions de stockage. La concentration en composés phénoliques est aussi influencée par la saison, où la lumière stimule la biosynthèse des polyphénols chez les plantes par l'amplification de certaines activités enzymatiques, dont l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qui convertit la phénylalanine en acide coumarique, qui est le précurseur des molécules impliquées dans la synthèse des composés phénoliques.

### 1.3. Evaluation de la cytotoxicité de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei*

Le test de cytotoxicité a été réalisé en utilisant le bleu de trypan ou le bleu de méthylène. En microscopie photonique les neutrophiles morts apparaissent colorés en bleu foncé suite à la pénétration irréversible du colorant, contrairement aux cellules vivantes qui restent non colorées (figure 17).



**Figure 17 : Dénombrement des cellules mortes sous microscope photonique au G x 40.** Les neutrophiles traités à des concentrations croissantes de l'extrait aqueux de feuilles de *phlomis bovei* [0, 25, 50, 100, 200] ont été incubés pendant 1 heure à 37°C. Le taux de viabilité est déterminé par dénombrement sous microscope photonique des cellules vivantes (figure à gauche). L'histogramme (figure à droite) représente la moyenne des essais.

Le test consiste à l'incubation des PN avec l'extrait aqueux de *Phlomis bovei* à des concentrations croissantes pendant 60 minutes à 37°C, en mélangeant les cellules de temps en temps. A la fin de l'incubation un dénombrement des cellules mortes est établi sur un nombre de 100 pour chaque condition et chaque échantillon. Nous avons compté les cellules vivantes qui apparaissent transparentes et les cellules mortes qui apparaissent en bleu foncé.

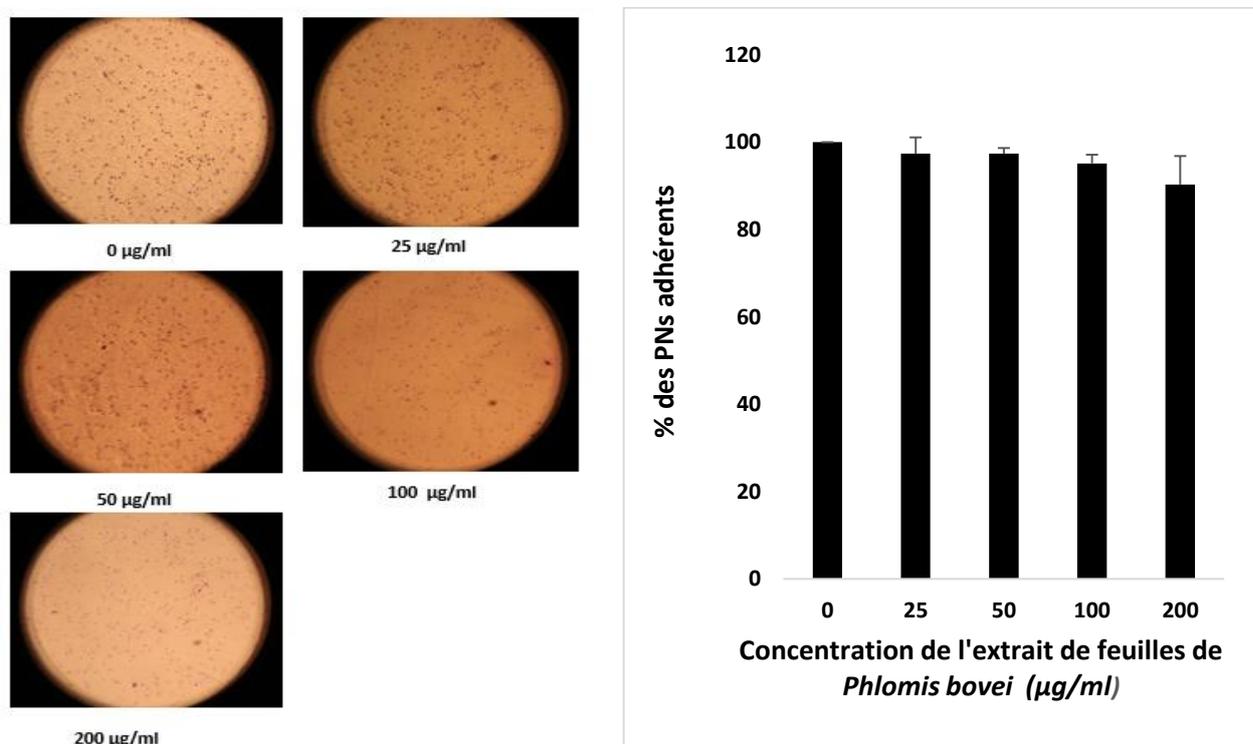
L'effet de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* sur les PN est représenté sur l'histogramme de la figure 17. Le taux de viabilité des PN dépasse les 90%, ce qui signifie que le taux des cellules mortes est négligeable. L'analyse statistique de ces résultats a montré que l'extrait n'a pas eu d'effet toxique sur les neutrophiles même aux fortes concentrations utilisées de l'extrait.

Selon des études précédentes sur l'espèce *Phlomis bovei*, l'extrait de cette plante est connu pour sa richesse en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes et les polyphénols. Cette richesse en ces molécules a été confirmée par notre analyse de l'extrait. La méthode de Folin a révélé un taux de 56 mg EAG/g d'extrait et le dosage des flavonoïdes a révélé un taux de 25 mg EQ/g d'extrait.

La non toxicité de notre extrait sur les PNs confirme l'usage important de cette plante en médecine traditionnelle dans de nombreuses régions. En Algérie, le genre *Phlomis* est utilisé pour soigner les inflammations et les rhumatismes (KABOUCHE *et al.*, 2004).

#### 1.4. Evaluation de l'effet de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* sur l'adhérence des neutrophiles

Pour tester l'effet de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* sur l'adhérence des neutrophiles, nous avons réalisé un test d'adhérence de ces derniers en présence de l'extrait à des concentrations croissantes. Les cellules adhérentes colorées avec le cristal violet ont été observées sous microscope inversé (figure 18).



**Figure 18 : Observation de neutrophiles adhérents traités à l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* à des concentrations croissantes sous microscope inversé au G x4.** Les neutrophiles ont été incubés avec des concentrations croissantes de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* [0, 25, 50, 100, 200] µg/ml pendant 15 min à 37 °C. Le taux des cellules adhérentes est déterminé par un dénombrement des cellules non adhérentes colorées avec le cristal violet sous microscope photonique, le résultat de l'histogramme de droite représente la moyenne de plusieurs essais. Les cellules adhérentes sont visualisées en microscopie inversé (gauche de la figure).

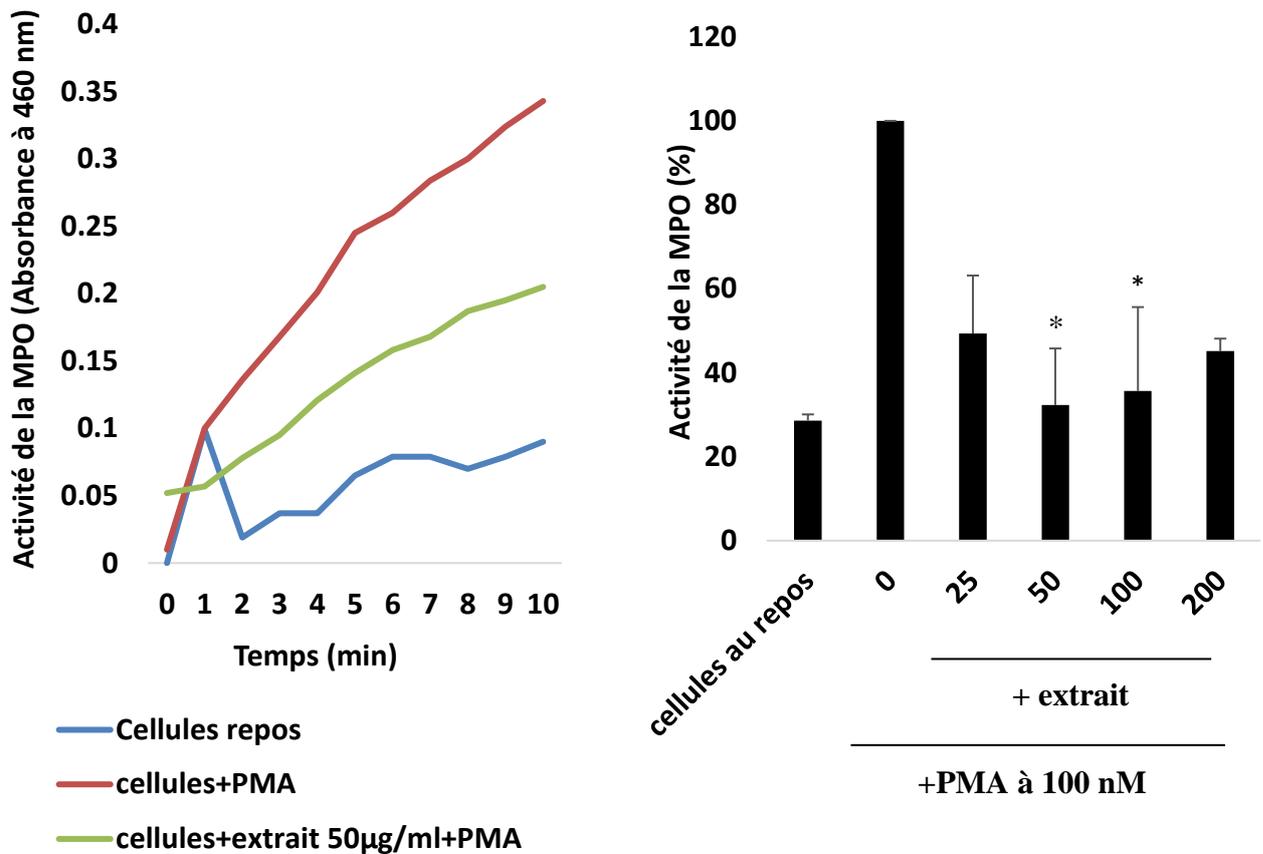
L'effet de l'extrait aqueux de *Phlomis bovei* sur l'adhérence des PNs est représenté sur l'histogramme de la figure 18. Les résultats obtenus montrent que pour le control négatif les cellules sont adhérentes à 100%. Dans les autres dilutions, le pourcentage des PNs diminue légèrement jusqu'à 90% avec l'augmentation des concentrations de l'extrait, mais de façon non significative.

Cette faible diminution du nombre de cellules adhérentes s'explique par la variation de divers facteurs qui rentrent en jeu tels que les variations entre donneurs, la différence d'expression des récepteurs d'adhésion variable pour chaque individu et probablement une sensibilité des neutrophiles vis-à-vis de l'extrait, loin de la cytotoxicité.

Parmi les études menées sur la composition phytochimique des plantes, l'étude de COWAN (1999) a montré que les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins sont connus pour leur capacité à se complexer avec des protéines d'adhésion et aux parois cellulaires.

### **1.5. Evaluation de l'effet de l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* sur la dégranulation des polynucléaires neutrophiles**

La dégranulation permet une libération du contenu des granules dans le phagosome et dans le milieu extracellulaire tel que la MPO qui est une enzyme synthétisée et stockée en grande quantité dans les granules azurophiles jouant un rôle dans l'élimination du pathogène. Nous nous sommes intéressés sur l'effet de l'extrait aqueux de *Phlomis bovei* sur la dégranulation des PNs en mesurant l'activité de la MPO qui est un marqueur spécifique des granules azurophiles. Les cellules traitées à l'extrait ont été stimulées par le PMA et incubées pendant 2h30min afin d'induire la dégranulation. Après une centrifugation, on a récupéré le surnageant qu'on a dosé par spectrophotométrie en ajoutant l'orthodianizidine et le peroxyde d'hydrogène et l'activité de la MPO a été mesurée à 460 nm (figure 19).



**Figure 19 : Mesure de l'activité de la myéloperoxydase.** L'activité de la MPO est représentée par les cellules traitées à 50µg/ml de l'extrait + PMA (vert) ; cellules de contrôle positif (rouge) et les cellules de contrôle négatif (bleu) (Graphes à gauche de la figure). Les différents surnageants traités à des concentrations croissantes de l'extrait [0, 25, 50, 100, 200] µg/ml et stimulés avec le PMA à 100 nM, les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle (cellules au repos non traitées au PMA) (Histogramme à droite de la figure).

Nous avons observé une activité maximale de la MPO dans le contrôle positif (cellules stimulées au PMA) induite par le PMA (100nM). Les cellules traitées à l'extrait (50µg/ml) et stimulées avec la même concentration du PMA montrent une activité de la MPO plus importante par rapport à l'activité des cellules au repos qui reste négligeable, ce qui signifie que le PMA est un bon inducteur de dégranulation. L'histogramme de la figure 19 a montré que la libération de la

MPO induite par le PMA est inhibée en présence de l'extrait à de faibles concentrations sans avoir aucune toxicité sur les cellules aux doses utilisées. D'après cette réduction significative de dégranulation des PNs induite par le PMA en présence de l'extrait à des concentrations croissantes mesurée par l'activité de la MPO, nous confirmons que l'extrait peut éventuellement avoir des effets anti-inflammatoires. Comme cette inhibition peut être en partie dû à la présence des polyphénols et des flavonoïdes qui sont connus comme étant de puissants piègeurs de radicaux libres en particulier le peroxyde d'hydrogéné.

**Tableau V : Quantité de protéines dans le surnageant des neutrophiles.**

Échantillons	contrôle négatif	PMA	25	50	100	200
[protéines] (µg/ml)	34,81481481	33,7037037	29,6296	28,8889	25,1852	35

Le résultat du dosage des protéines a montré que la concentration de ces dernières varie légèrement entre les différent surnageants récupérés après la dégranulation des PNs. Cette concentration se situe dans un intervalle de 25 à 35 µg/ml.

### Conclusion et perspectives

Dans la présente étude, les neutrophiles ont été choisis comme modèle cellulaire *in vitro* pour évaluer l'effet de l'extrait aqueux de feuilles de *phlomis bovei* sur quelques fonctions des PN. L'interaction des PN avec les pathogènes induit un programme de défense tel que la phagocytose, la production des FRO par le processus d'explosion oxydatif, la dégranulation par libération extracellulaire d'enzymes bactéricides et des NETs capables d'immobiliser les pathogènes et facilitent leur digestion afin de réduire la réaction inflammatoire. Toute dérégulation de ces mécanismes finement orchestrés peut conduire à une infiltration tissulaire persistante par des neutrophiles, à leur activation prolongée ou dans un lieu inapproprié induisant des lésions tissulaires et participant à la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires. Dans ce contexte, les plantes médicinales sont connues pour leurs usages dans la médecine traditionnelle du fait de leur richesse en molécules bioactives dotées d'un pouvoir anti-inflammatoire. Pour cela, on s'est intéressé à l'étude de l'effet de notre extrait aqueux de feuilles de *phlomis bovei* sur une propriété et une fonction des PN, notamment l'adhérence et la dégranulation qui sont des éléments clés pour une cellule immunitaire effectrice.

A travers cette étude, nous avons montré que la teneur de polyphénols et de flavonoïdes contenue dans cet extrait n'est pas toxique pour les PN humains *in vitro* et le taux de viabilité dépasse les 90% même à de fortes concentrations de l'extrait. En effet, plusieurs études ont démontré l'effet direct des polyphénols et des flavonoïdes sur l'adhérence des cellules. Cependant, notre résultat montre que cet extrait n'a pas d'effets sur l'adhérence cellulaire du fait qu'il est pauvre en ces composés. Nous avons montré également un effet inhibiteur intéressant sur la dégranulation, cette inhibition était de 50% en moyenne à de faibles concentrations (50µg/ml).

Cette thématique nous a offert d'une part, l'opportunité de maîtriser le processus d'isolement des PN par la méthode de Dextran-ficoll, d'étudier l'effet cytotoxique de l'extrait sur les PN ainsi que son effet sur une propriété et une fonction. D'autre part, nous avons pu mettre au point la technique de dégranulation avec le PMA sachant que ces applications n'ont pas été déjà réalisées avec cet extrait au sein de notre laboratoire. Nous avons également essayé de réaliser le test de chimiotactisme par la technique de migration sous agarose mais nous n'avons pas réussi à faire la mise au point faute de moyens.

Ce travail peut être le point de départ d'autres études des effets des différents composés de *Phlomis bovei* sur le traitement des maladies inflammatoires. De nombreuses activités physiologiques humaines, telles que la stimulation des cellules phagocytaires, l'activité tumorale à médiation par l'hôte et un large éventail d'actions anti-infectieuses, ont été attribuées aux tanins. Ce groupe de composés a fait l'objet d'une attention soutenue ces dernières années, car il a été suggéré que la consommation de boissons contenant du tanin, en particulier de thés verts et de vins rouges, pouvait guérir ou prévenir divers maux.

Les résultats obtenus pour la dégranulation sont importants et nécessitent :

- ✓ Une confirmation avec la technique de Western blot afin de vérifier la quantité de la MPO dans les surnageants.
- ✓ Une vérification du mécanisme d'inhibition de l'activité de la MPO.
- ✓ En perspective, la richesse de cet extrait en molécules anti-oxydantes nécessite et impose une évaluation de son pouvoir anti-oxydant étant donné qu'il ne présente pas de cytotoxicité envers les PNs, ni l'interférence avec leur adhésion.
- ✓ L'évaluation de l'effet de l'extrait de *Phlomis bovei* sur un modèle animal serait nécessaire afin de comprendre le comportement de l'organisme vis-à-vis les différents composés de cet extrait.

## **Références bibliographiques**

**ALBALADEJO R G., AGUILAR J F., APARICIO A and GONZALO N. (2005).** Contrasting nuclear-plastidial phylogenetic patterns in the recently diverged Iberian *phlomis crinita* and *p. lychnitis* lineages.

**AMULIC B., CAZALET C., HAYES GL., HAYES GL., METZLER KD and ZYCHLINSKY A. (2012).** Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.*; 30:49-89.

**ANDERSON S I., HOTCHIN N A and NASHG.B. (2000).** Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *J.Cel/ Sei.*113 (Pt 15):2737-2745.

**ARNHOLD J and FLEMMIG J. (2010).** Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* Elsevier.

**ASHTEKAR AR and SAHA B. (2003).** Poly's plea: membership to the club of APCs. *Trends in Immunology* 24: 485-490

**BAINTON F D., MILLER L J, KISHIMOTO T K and SPRINGER T A. (1987).** Leucocyte Adhesion Receptors Are Stored in Peroxidase-Negative granules Of Human Neutrophils. *Volume 166.* 641-1653.

**BARRIENTOS L., MARIN-ESTEBAN V., de CHAISEMARTIN L., Le-MOAL VL., SANDRE C., BIANCHINI E., NICOLAS V., PALLARDY M and CHOLLET-MARTIN S. (2013).** An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*

**BARROWMAN M M., COCKCROFT S and GOMPERTS B D. (1987).** Differential control of azurophilic and specific granule exocytosis in Sendai-virus-permeabilized rabbit neutrophils. *J. Physiol.* 383:115-124.

**BEAUVILLAIN C., CUNIN P., DONI A., SCOTET M., JAILLON S., LOIRY ML., MAGISTRELLI G., MASTERNAK K., CHEVAILLER A., DELNESTE Y and JEANNIN P. (2011).** CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* 117: 1196–1204.

**BEDOUHENE S. (2018).** Capacité anti-oxydante des polyphénols issus de l'olive et des margines sur les fonctions du neutrophile humain dans les conditions de stress oxydatif : Identification des cibles moléculaires de l'oleuropeine et de l'hydroxytyrosol. Thèse de doctorat. Université de Mouloud Mammeri Tizi Ouzou.

**BEDOUHENE S., MOULTI-MATI F., MY-CHAN DANG P., EL-BENNA J. (2017).** Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the N-formyl-methionylleucyl- phenylalanine-induced neutrophil dégranulation and chemotaxis via AKT, p38, and ERK1/2 MAP-Kinase inhibition. Springer.

**BORREGAARD N. (2010).** Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33(5):657-670.

**BORREGAARD N and COWLAND J B. (1997).** Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89(10): p. 3503-21.

**BRADLEY P P., PRIEBAT D A., CHRISTENSEN R D., ROTHSTEIN G. (1982).** Measurement of cutaneous inflammation; estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.*, 78, 206–209.

**CANTINO P D., HARLEY R M et WAGSTAFF J. (1992).** Genera and classification. In Harley, R.M. Reynolds. (eds) *Advances in Labiate science*. Royal Botanic Gardens, kew. 511-522.

**CANTLEY L C. (2002).** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573):1655-1657.

**CAPOCCIA B J., GREGORY D C and LINK D C. (2008).** Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte

chemoattractant protein-1-dependent fashion. Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA.

**CHAKRAVATI A., ALLAEYS I., POUBELLE P E. (2007).** Neutrophile et immunité est-ce inné ou acquis? Médecine/Sciences <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/20072310862>.

**COSTA M F., JESUS T L., LOPES B R P., ANGOLINI C FF., MONTAGNOLLI A., GOMES L P., PEREIRA G S., GOIS RUIZ A L T., CARVALHO J E., EBERLIN MN., SANTOS C D and TOLEDO K A. (2016).** *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.

**COWAN M M.(1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* v.12(4);564-82.

**DUMAS A et POULIOT M. (2009).** Le neutrophile : ennemi ou ami ? *MEDECINE/SCIENCES*, 25 : 699-704.

**DUPONT C. (2018).** Les granulocytes neutrophiles : morphologie, fonctions et méthodes de quantification dans l'espèce bovine. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 78 p.

**EDWARDS S W. (1994).** *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Cambridge University Press, New York.

**EI-BENNA J., DANG P M. (2007).** Analysis of protein phosphorylation in human neutrophils. *Methods Mol Biol* 412:85–96.

**FAURSCHOU M and BORREGAARD N. (2003).** Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 5. 1317–1327. Elsevier.

**FUNAMOTO S., MEILI R., LEE S., PARRY L and FIRTEL R A. (2002).** Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cel*/109(5):611-623.

**GALKINA S I., FEDOROVA N V., SEREBRYAKOVA M V., ARIFULIN E A., STANDNICHUK V I., BARATOVA L A and SUD'INA G F.(2017).** Mold Alkaloid Cytochalasin D Modifies the Morphology and Secretion of fMLP-, LPS-, or PMA Stimulated Neutrophils upon Adhesion to Fibronectin. Magdalena Klink. Moscow, Russia.

**GHEDADBA N., HAMBAB L., AYACHI A., ABERKANE M C., BOUSSELSLA H et OUELD-MOKHTAR S M. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubiumdeserti de Noé*.Lavoisier SAS. vol.13 ; 118-129.

**GOUGEROT-POCIDALO M A., EI BENNA J., ELBIM C., CHOLLET-MARTIN S. et DANG M C. (2002).** Régulation de l'explosion oxydative des polynucléaires neutrophiles humains par les cytokines pro- et anti-inflammatoires.Journal de la Société de Biologie, 196 (1), 37-46.

**GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO-NEDELEC M. (2011).** Déficiets primitifs de la fonctiondes polynucléaires neutrophiles. Elsevier Masson SAS.

**GREGOIRE M. (2014).** Polynucléaires neutrophiles, cellules stromales, lymphocytes B : interaction tripartite dans la niche des lymphomes B. Cancer. Université Rennes 1. Français. NNT : 2014REN1S156. tel-01417799f.

**HAENEN G R., ARTS M J., BAST A and COLEMAN M D. (2006).** Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo: A critical appraisal illustrated with the flavonoids. Environmental toxicology and pharmacology, 21(2), 191-198.

**HAGER M., COWLAND J B and BORREGAARD N. (2010).**Neutrophil granules in health and disease. J. InternMed. 268(1):25-34.

**HAMMOUDI R. (2015).** Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien : thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah – Ouargla.

**HEIM K E., TAGLIAFERRO A R and BOBILY D J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.

**HEIT B., ROBBINS S M., DOWNEY C M., GUAN Z., COLARUSSO P., MILLER B J., JIRIK F R and KUBES P. (2008).** PTEN functions to prioritize chemotactic cues and prevent distraction in migrating neutrophils. *Nat. Immunol.* 9(7):743-752.

**HEIT B., TAVENER S., RAHARJO E and KUBES P. (2002).** An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *The Journal of Cell Biology*, 159(1), 91–102.

**JANEWAY A C., TRAVERS P., WALPORT M., SHLOMCHIK M J. (2003).** Immunobiologie. Le système immunitaire fondamental et pathologique (2<sup>e</sup> Ed). deboeck. Paris, France.

**KABOUCHE A., KABOUCHE Z., SEGUIN E., TILLEQUIN F et BRUNEAU C. (2005).** A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *phlomis crinita* (*Lamiaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(8). 813-816.

**KANG T., YI J., GUO A., WANG X., OVERALL C.M., JIANG W., ELDE R., BORREGAARD N and PEI D. (2001).** Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 276: 21960–21968.

**KATAYOUN M.S., MOHAMMED A., AFSANEH G. (2004).** The essential oils composition of *phlomis herba-venti* L. leaves and flowers of Iranian origin. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 29-31.

**LIMEM-BEN AMOR I., BOUBAKER J., BEN SAGAIER M., SKANDRANI I., BHOURI W., NEFFATI A., KILANI S., BOUHLEL I., GHEDIRA K., CHEKIR-GHEDIRA L. (2009).** Phytochemistry and biological activities of *phlomis* species. *Journal of ethnopharmacology*. 125, [183-202].

**LIOLIOS C., LAOUER H., BOULAACHEB N., GORTZI O et CHINOUI I. (2007).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *Phlomis bovei* De Noe subsp. *bovei*, *Molecules*, 12, 772-781.

**LI M X., SHANG X F., JIA Z P and ZHANG R X. (2010).** Phytochemical and biological studies of plants from the genus *phlomis*. *Chemistry and Biodiversity*, vol.7 (2), [283-301].

**LOWRY O H., ROSEBEROUGH N J., FARR A L., RONDALL R J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. boil. Chem.* Vol 193 no 1. P. 265-275.

**MICHAUD A. (2009).** L'adénosine déclenche un ensemble de signaux d'arrêt chez le neutrophile inflammatoire : étude par génomique. Faculté de médecine université laval Québec.

**MOULDING D A., AKGUL C., DEROUET D., WHITE M R H and EDWARDS S W. (2001).** BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *V (70). Journal of Leukocyte Biology.*

**OZENDA P. (1991).** Flore et végétation du Sahara.(2<sup>e</sup>Ed). CNRS EDITIONS. Paris, France.

**QUEZEL F., SANTANA S.,** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions Désertiques Méridionales, 1.2, 801-802 Ed CNRS, Paris France 1962-1963.

**ROOS D., BRUGGEN R V., MEISCHL C. (2003).** Oxidative killing of microbes by neutrophils. Elsevier SAS.1307–1315

**SAADOUN S R., SAIFI I et ZIANE M. (2018).** Evaluation des activités biologiques des extraits d'une plante algérienne appartenant au genre *Mentha*. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine.

**SAMYDURAI P., THANGAADIAN V. (2012).** Nutritional assessment, polyphenols evaluation and antioxidant activity of food resource plant (*Decalpis hamiltonii*) Wight and Arn. *Journal of applied pharmaceutical science.* 02 (05): 106-110.

**SATHIYANADAN K., COISNE C., ENZMANN G., DEUTSCH U., ENGELHARDT B. (2014).**PSGL-1 and E/P-selectins are essential for T-cell rolling in inflamed CNS microvessels but dispensable for initiation of EAE. *Eur J Immunol.* 44(8): p. 2287-94.

**SERTEYN D., GRULKE S., FRANCK T., MOUTHYS-MICKALAD A., DEBY-DUPONT G. (2003).** La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vé.* 147, 79-93.

**SIMON H U. (2003).** Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunological Reviews.* Vol. 193: 101–110.

**SOEHNLEIN O. (2009).** Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J Mol Med (Berl)* 87(12):1157-1164.

**ST-ONGE M. (2005).** Le Neutrophile Humain. Mémoire de maîtrise. Université Laval, Québec.

**STASIA M J., CATHEDRAS P., LUTZ M F., DURIEUI. (2009).** La granulomatose septique chronique. Elsevier Masson, 221–232.

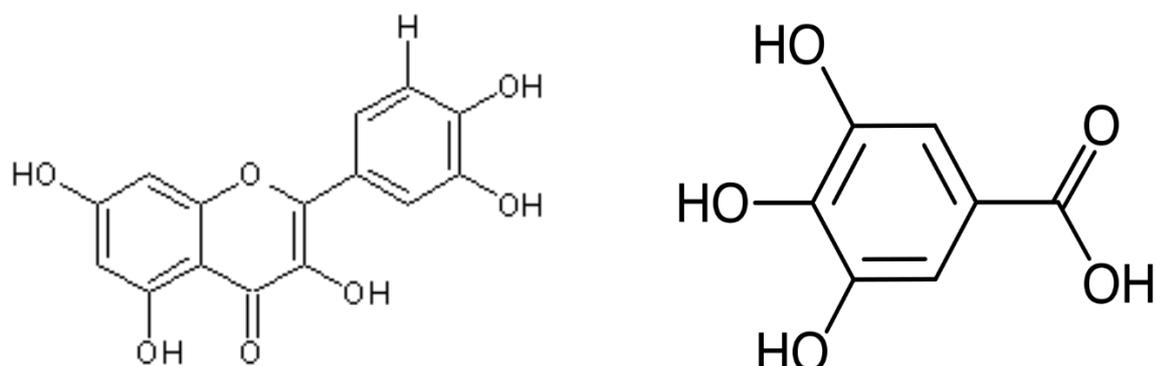
**WITKO-SARSAT V., RIEU P., DESCAMPS-LATSCHA B., LESAVRE P and HALBWACHS-MECARELLI L. (2000).**Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lob Invest*80(5):617-653.

**YESILADA E and GURBUZ I. (2002).** A complication of the studies on anti-ulcerogenic effects of medicinal plants. Recent progress in medicinal plants, vol. II, In: S. Singh, V. K.singh, J.N Govil. Ed. *Phytochemistry and Pharmacology*, SCI TechPublishing LLC, pp.111-124. Houston, Texas.

**ZAABAT N., DARBOUR N., BAYET C., MICHALET S., DOLEANS-JORDHEIM A., CHEKIR-GHEDIRA L., AKKA S., DIJOUX-FRANCA M G. (2010).** Étude préliminaire de *Marrubium deserti de Noé*, une Lamiaceae endémique algérienne. Springer Verlag France.

**ZHANG Y and WANG Z. (2008).** Comparative analysis of essential oil components of three *Phlomis* species in Qinling Mountains of China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47. 213–217.

# **Annexe**

**Annexe 1 : Structure chimique de la quercétine et de de l'acide gallique.**


QuercétineAcide gallique

**Annexe 2: Les concentrations de la quercétine utilisées pour le dosage des flavonoïdes dans l'extrait aqueux de Phlomis bovei.**

Concentrations de quercétine ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	10	20	30	40	50	60
DO à 425 nm	0	0,05	0,104	0,171	0,217	0,257	0,301

**Annexe 3 : Les concentrations d'acide gallique utilisées pour le dosage des polyphénols dans l'extrait aqueux de Phlomis bovei.**

Concentrations d'acide gallique ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	10	20	40	60	70	80
DO à 760 nm	0	0,229	0,526	1,139	1,821	2,027	2,4

**Annexe 4 : Les concentrations de la BSA utilisées pour le dosage des protéines de dégranulation.**

Concentration de BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	15	25	40	50
DO à 750 nm	0	0,048	0,069	0,103	0,137

**Annexe 5: Test statistique de viabilité**

Tests t ; Classmt : tests (statistica)											
Groupe1: ratio 1											
Groupe2: ratio 2											
Variable	Moyenne ratio 1	Moyenne ratio 2	Valeur t	dl	p	N Actifs ratio 1	N Actifs ratio 2	Ecart-Type ratio 1	Ecart-Type ratio 2	Ratio F Variances	p Variances
<b>Viabilité</b>	96,08696	98,65817	-1,40560	8	0,197469	5	5	3,653856	1,838569	3,949505	0,211932

**Annexe 6 : Test statistique d'adhérence**

Tests t ; Classmt : test (statistica)											
Groupe1: ratio 1											
Groupe2: ratio 2											
Variable	Moyenne ratio 1	Moyenne ratio 2	Valeur t	dl	p	N Actifs ratio 1	N Actifs ratio 2	Ecart-Type ratio 1	Ecart-Type ratio 2	Ratio F Variances	p Variances
<b>adhérence</b>	94,11613	97,94715	-1,49810	8	0,172485	5	5	5,270630	2,217684	5,648405	0,122131

## Annexe 7 : Test statistique de dégranulation

<ul style="list-style-type: none"> <li>Family</li> <li>Data Tables <ul style="list-style-type: none"> <li>Data 1</li> </ul> </li> <li>Info <ul style="list-style-type: none"> <li>Project info 1</li> </ul> </li> <li>Results <ul style="list-style-type: none"> <li>1way ANOVA of Data 1</li> </ul> </li> <li>Graphs <ul style="list-style-type: none"> <li>Data 1</li> </ul> </li> <li>Layouts</li> </ul>		A	B	C	D	E	F	G
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D	Data Set-E	Data Set-F	Title
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1	27.108440	100	35.542170	45.783130	15.662650	42.168670	
	2	30.075190	100	63.157890	18.796990	55.639100	48.120300	
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
8								
9								

2						
3	One-way analysis of variance					
4	P value	0.0324				
5	P value summary	*				
6	Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
7	Number of groups	6				
8	F	5.344				
9	R squared	0.8166				
10						
11	ANOVA Table	SS	df	MS		
12	Treatment (between columns)	6977	5	1395		
13	Residual (within columns)	1567	6	261.1		
14	Total	8543	11			
15						
16	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
17	Column A vs Column B	-71.41	6.250	Yes	*	-135.7 to -7.103
18	Column A vs Column C	-20.76	1.817	No	ns	-85.06 to 43.55
19	Column A vs Column D	-3.696	0.3237	No	ns	-68.00 to 60.61
20	Column A vs Column E	-7.059	0.6178	No	ns	-71.36 to 57.25
21	Column A vs Column F	-16.55	1.449	No	ns	-50.65 to 47.75
22	Column B vs Column C	50.65	4.433	No	ns	-13.65 to 115.0
23	Column B vs Column D	67.71	5.926	Yes	*	3.405 to 132.0
24	Column B vs Column E	64.35	5.632	Yes	*	0.04425 to 128.7
25	Column B vs Column F	54.66	4.801	No	ns	-9.449 to 119.2
26	Column C vs Column D	17.06	1.493	No	ns	-47.24 to 81.36
27	Column C vs Column E	13.70	1.199	No	ns	-50.61 to 78.00
28	Column C vs Column F	4.206	0.3681	No	ns	-60.10 to 68.51
29	Column D vs Column E	-3.361	0.2941	No	ns	-67.67 to 60.94
30	Column D vs Column F	-12.85	1.125	No	ns	-77.16 to 51.45
31	Column E vs Column F	-9.494	0.8309	No	ns	-73.90 to 54.81
32						

## Résumé

Des données récentes montrent que certains métabolites secondaires issus de quelques plantes médicinales, tels que les polyphénols et les flavonoïdes ont de nombreuses vertus pour la santé et présentent des effets pharmacologiques intéressants. Dans ce contexte, en utilisant le neutrophile humain comme modèle cellulaire, nous avons évalué les effets d'un extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei*, sur l'adhérence et la dégranulation de ces cellules, mécanismes importants dans la réaction inflammatoire médiée par le PN. Nous avons caractérisé le lyophilisat de *Phlomis* issus de l'infusion par dosage des flavonoïdes et des polyphénols présents à raison de  $25 \pm 2,3$  mg EQ/g et  $56 \pm 4$  mg EAG/g d'extrait respectivement. Par la méthode de Dextran-ficoll nous avons isolé des PNs humains à partir de sang frais. Nous avons évalué la cytotoxicité de l'extrait aqueux de feuilles sur ces derniers en utilisant la méthode d'exclusion au bleu de trypan, ainsi que son effet sur l'adhérence et la dégranulation avec le PMA (phorbol myristate acetate) comme stimulant. D'après nos résultats, l'extrait n'a pas montré d'effet cytotoxique envers les PNs y compris aux plus fortes doses ( $200 \mu\text{g/ml}$ ). L'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* a montré un effet inhibiteur intéressant sur la dégranulation des neutrophiles induite par le PMA, en effet le taux d'inhibition de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) était d'environ 50% à  $50 \mu\text{g/ml}$  d'extrait. Soulignant que la MPO est un marqueur spécifique des granules azurophiles, jouant un rôle important dans l'élimination des pathogènes. L'adhérence des cellules n'a pas été affectée par l'extrait aqueux de feuilles de *Phlomis bovei* quel que soit sa concentration. Nos résultats suggèrent que cet extrait aqueux de feuilles est capable de moduler la réponse inflammatoire en diminuant la dégranulation et réduire ainsi les pathologies associées à l'hyper activation des PNs, à savoir l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, en plus de n'avoir aucune cytotoxicité envers les cellules, ni d'interférence avec leur adhésion.

**Mots clés :** *Phlomis bovei*, Flavonoïdes, Polyphénols, Neutrophiles, Adhérence, Dégranulation.

