

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Science biologique
Option : Biochimie appliquée



Réf :.....

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

MASTER

Thème

Activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de bourgeons de *Populus nigra*

Présenté par :

M^{elle} Abbou Amina et M^{elle} Bedjih Farida
Soutenu : 18 / 06 / 2017

Devant le jury composé de :

| | | |
|-----------------------------|-----|-----------|
| M ^{me} Kara. S | MAA | Président |
| M ^{me} Debbache. N | MCB | Encadreur |
| M ^{me} Sebaihi. S | MAA | Examineur |

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier Mme Debbache Nadjat de nous avoir encadré et dirigé durant la réalisation de ce travail avec une grande rigueur scientifique ; merci madame pour tout le savoir que vous nous avez transmis, pour les commentaires qui ont enrichis ce travail que ce soit la partie expérimentation ou rédaction.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour leur collaboration à l'examen de ce travail, merci Mme Kara et Mme Sbaihi.

Mes remerciements s'adressent aussi à la doctorante Benloukil Malika pour son aide précieuse, pour le partage de ses expériences, et sa gentillesse.

Je ne saurais assez exprimer mes remerciements à Mlle Tabti Naima, l'ingénieure du laboratoire Biologie Physico-Chimique (BPC) pour son aide, ses conseils, sa compréhension et son extrême gentillesse.

Un grand merci est adressé à ma collègue Abbou Amina avec qui j'ai partagé toutes les étapes menant à la naissance de ce travail.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier tous les membres de ma famille et mes amis pour leur soutien, encouragement et pour l'énergie positive qu'ils me transmettent toujours.

Farida

Remerciements

Je remercie tout d'abord dieu le tout puissant qui m'a permis de mener à bien ce travail. Je ne remercierai jamais assez mes chers parents Papa et Maman de m'avoir toujours soutenu et épaulé et d'avoir veillé à mon éducation, leur fierté à mon égard est aujourd'hui pour moi la meilleure des récompenses

Je tiens à témoigner toutes ma reconnaissance à notre promotrice madame Debbache Nadjet qui nous a fait l'honneur d'encadrer notre travail, pour sa disponibilité, ses encouragements ses conseils judicieux aussi bien sur le plan scientifique et humain et pour la formation qu'elle nous a offert.

Ce travail n'aurait pas pu avoir lieu sans l'ingénieure du laboratoire de biologie physico-chimique 'Naima' qui a fait preuve de patience, et qui nous a aidé sur tous les plan. Mes sincères remerciements s'adressent à madame Djama directrice du laboratoire d'analyses médicales et tout son personnel surtout la technicienne Werda qui n'a jamais su me refuser. Je suis très honorée par la présence de Mme Kara et Mme Sbaili dans mon jury.

J'adresse aussi mes chaleureux remerciements à tous les enseignants du département biologie physico-chimique qui ont veillé sur notre formation

Je ne saurais terminer sans remercier ma binôme Bedjih Farida avec qui j'ai partagé tous les moments de stress de fatigue, mais aussi de fous rires ainsi que tous mes amis qui m'ont épaulé d'une manière ou d'une autre particulièrement : Moussa, Soumia, Alice, Aida, Narimene, Radia, Hiba, Toufik, Latifa, Sofi, Lina et toute la promotion de biochimie appliquée 2016/2017.

Amina

Dédicaces

A l'aide de dieu le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que

je dédie :

A mes très chers parents

A mes frères

A toute ma famille : mes très chers grand-mères, tantes et oncles, cousins et cousines

A tous mes amis.

Amina

Dédicaces

C'est avec l'aide et la grâce du Dieu qu'on a achevé ce modeste travail que je dédie :

A mes Chers parents qui ne cessent de m'encourager et de prier pour moi, que Dieux vous garde longtemps près de nous.

A ma sœur et mon frère, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A toutes mes amies

A tous ceux que j'aime et que j'estime,

A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé durant la réalisation de ce travail et qui m'ont soutenu moralement.

Farida

Liste des abréviations

AA: Acide arachidonique

ABTS : 2,2-azino- bis-3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonate

AC : Acide caféique

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens

AlCl₃: Trichlorure d'Aluminium

ANOVA : ANalysis Of Variance

AQ: Extrait aqueux

AS: Acide salicylique

ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain

BSA: Bovin serum albumin

COX : Cyclooxygénase

EAG : Equivalent d'acide gallique

EAT : Equivalent d'acide tannique

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EQ : Equivalent de quercétine

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FC : Folin-Ciocalteu

FDA: Food and drug administration

GC : Glucocorticoïdes

H₂O₂ : Le peroxyde d'hydrogène

HE : Extrait hydro-éthanolique

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

IκB : l'inhibiteur de NFκB

LISTE DES ABBREVIATIONS

IL : Interleukine

iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible

LOX : lipooxygénase

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NFκB: Nuclear Factor kappa B

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NO: Monoxyde d'azote

O₂⁻ : Anion superoxide

OH[•] : Le radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Platelet Activating Factor

PGE2 : prostaglandine E2

PBS: Phosphate buffer salin (tampon phosphate)

PGI2: prostaglandines I2

PLA2: Phospholipase A2

RL : Radicaux libres

SDS: Sodium dodecyl sulphate

TEA: triéthylamine

TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha

UV: Ultra-violet

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01: Médiateurs et événements cellulaires d'une réaction inflammatoire aiguë..... | 3 |
| Figure 02: Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 et libération d'IL-1 β | 6 |
| Figure 03: Théorie des COXs et points d'impact des AINS..... | 7 |
| Figure 04: Images de différentes parties du peuplier noir | 10 |
| Figure 05: Schéma résumant le protocole expérimental de dosage des tannins totaux..... | 16 |
| Figure 06: Processus de réduction du radical ABTS ⁺ en ABTS en présence d'un antioxydant..... | 20 |
| Figure 07: Image de l'extrait aqueux..... | 24 |
| Figure 08: Image de l'extrait hydro-éthanolique..... | 24 |
| Figure 09: Test de cyto-toxicité des extraits AQ et HE à différentes concentrations sur les érythrocytes..... | 26 |
| Figure 10: La différence entre le control négatif et le control positif | 27 |
| Figure 11: L'aspect des échantillons traités avec les extraits ainsi que les standards aux concentrations maximales testées | 27 |
| Figure 12: Activité anti-hémolytique des extraits (AQ et HA) ainsi que des standards (AS et AC) à différentes concentrations..... | 28 |
| Figure 13: Activité anti-radicalaire des extraits et des standards à une concentration de 0,1 mg/ml..... | 30 |
| Figure 14: Activité anti-radicalaire des extraits et des standards à différentes concentrations..... | 31 |
| Figure 15: Activité chélatrice du fer des extraits et des standards à une concentration de 0,1 mg/ml | 32 |
| Figure 16: Activité chélatrice du fer des extraits et des standards à différentes concentrations | 33 |
| Figure 17: Effet anti-péroxydation lipidique des extraits ainsi que des standards à différentes concentrations..... | 35 |

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux types d'inflammation.....2

Tableau II : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire.....4

Tableau III : Mode d'action anti-inflammatoire des flavonoïdes, acides phénoliques et des tanins.....9

Tableau IV : Protocole du test d'hémolyse induite par l'hypotonicité.....19

Tableau V : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux des deux extraits AQ et HE des bourgeons du peuplier noir..... 25

Tableau VI : IC₅₀ d'activité anti-radicalaire des extraits HE et AQ et les standards AC et AS.....31

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| I -Synthèse bibliographique | |
| I-1-Généralités sur l'inflammation..... | 2 |
| I-2- Lysosome et inflammation | 5 |
| I-3-Activité anti-inflammatoire..... | 7 |
| I-4- <i>Populus nigra</i> | 9 |
| II-Matériel et méthodes | |
| II-1- Matériel..... | 12 |
| II-1-1-Matériel végétal..... | 12 |
| II-1-2- Les érythrocytes..... | 13 |
| II-1-3-Matériel instrumental et réactifs chimiques..... | 13 |
| II-2- Méthodes et protocoles expérimentaux..... | 13 |
| II-2-1- Extraction..... | 13 |
| II-2-2- Analyse phytochimique..... | 14 |
| II-2-3- Test de cyto-toxicité des extraits hydro-éthanolique et aqueux des bourgeons de <i>Populus nigra</i> | 17 |
| II-2-4- Evaluation de l'activité anti- inflammatoire <i>in vitro</i> des extraits des bourgeons de <i>Populus nigra</i> par le test de stabilisation de la membrane..... | 18 |
| II-2-5-Tests de l'activité antioxydant..... | 19 |
| II-2-6-Analyse statistique..... | 22 |
| III-Résultats et discussion | |
| III-1- Rendement..... | 23 |
| III-2- Analyse phytochimique..... | 24 |
| III-3- Test de cyto-toxicité..... | 26 |

| | |
|--|----|
| III-4- Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> des extraits de bourgeons de <i>Populus nigra</i> | 27 |
| III-5- Activité antioxydant..... | 29 |
| Discussion générale | 37 |
| Conclusion | 39 |
| Références bibliographiques | 40 |

Introduction

En 1978, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'est résolument engagée à la recherche et à la valorisation de la pharmacopée traditionnelle, car les plantes médicinales constituent une alternative idéale aux médicaments chimiques ayant des effets secondaires trop importants, ou spécialités trop chers à fabriquer ou à acheter pour les pays en voie de développement (OMS, 2003).

La gemmothérapie est une thérapie utilisant les bourgeons des plantes, partant du principe que ces derniers regroupent toutes les caractéristiques de la plante entière (Hage *et al.*, 2017). L'utilisation des bourgeons du peuplier noir remonte à plusieurs siècles pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques telles que diurétique, éliminateur d'acide urique, aseptisant et fluidifiant des sécrétions bronchiques. Ils ont toujours été recommandés dans les maladies pulmonaires, urinaires et dans les rhumatismes chroniques (Beloued, 2001; Dudonné *et al.*, 2011; Siler *et al.*, 2014)

L'inflammation est une réponse immunitaire innée bénéfique à de nombreuses agressions, mais sa progression excessive devient pathologique et contribue à l'inflammation chronique (Ferreoro *et al.*, 2017).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* et pouvoir attribuer un mécanisme possible pour l'activité anti-inflammatoire des bourgeons du peuplier noir pour cela, notre travail sera développé selon le plan suivant:

- Une partie bibliographique qui expose dans un premier lieu les grands concepts relatifs aux processus inflammatoires et aux mécanismes d'action des anti-inflammatoires. En deuxième lieu, la classification et les différents usages thérapeutiques et les activités biologiques des bourgeons de *Populus nigra* seront abordés.
- Une étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux et hydro-éthanolique de ces bourgeons ainsi que des standards (Acide salicylique et acide caféique) qui sont des composants majoritaires de ces derniers en utilisant les érythrocytes comme modèle d'étude.

Pour compléter l'étude, l'activité antioxydant qui est fortement liée à l'inflammation a été étudiée pour les extraits par le pouvoir anti-radicalaire (ABTS), chélateur du fer et enfin par leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique.

I-Synthèse bibliographique

I-1-Généralités sur l'inflammation

I-1-1-Définition

L'inflammation est une réponse physiologique des tissus vivants vascularisés à toute une série de stimuli, tels que les infections et les lésions tissulaires. C'est un processus complexe faisant partie de la réponse immunitaire innée. Cliniquement elle se manifeste par quatre signes cardinaux à savoir rougeur, gonflement, chaleur et douleur (**Punchard et al., 2004**). Ce phénomène est habituellement bénéfique, son but est d'éliminer les agents pathogènes et de réparer les lésions tissulaires, mais elle peut aussi se compliquer et devenir pathologique (**Ferrero et al., 2007**).

Il existe deux principaux types d'inflammation : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique (**Rajagopala et al., 2013**) (Tableau I).

Tableau I : Principaux types d'inflammation (**Stevens et al., 2004**).

| Inflammation aiguë | Inflammation chronique |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Réponse physiologique immédiate à un agent pathogène de courte durée (quelques jours à quelques semaines). ➤ Caractérisée par une phase vasculaire, cellulaire, puis de réparation. ➤ Peut aboutir à une cicatrisation ou évoluer vers une inflammation chronique. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Réponse physiopathologique qui se manifeste pendant plusieurs semaines à plusieurs années. ➤ Apparaît lorsque la lésion de l'inflammation persiste ou lorsqu'une inflammation récidive de façon répétée dans le même organe. |

I-1-2-Le déclenchement de la réaction inflammatoire

En réponse à un stress, la phospholipase A2 (PLA2) transforme les lipides membranaires en acide arachidonique (AA). Ce dernier est à son tour métabolisé selon 2 voies : celle des lipooxygénases (LOX) qui le transforme en leucotriènes et celle des cyclooxygénases (COX) qui le transforme en prostaglandines E2 (PGE2) (**Min et al., 1996**). Ces deux produits ont un effet pro-inflammatoire par une production accrue de cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation qui diffusent dans les fluides extracellulaires et circulent dans le sang (**Gruys et al., 2005**).

I-1-3- Principales étapes de la réaction inflammatoire

Le déclenchement et le maintien de l'inflammation font appel à plusieurs médiateurs et modifications vasculaires permettant la réparation du tissu endommagé (figure 01). Ces différents médiateurs et modifications s'organisent suivant un ordre chronologique des trois principales phases de l'inflammation (phase vasculaire, cellulaire et de réparation) (Rousselet et al., 2005).

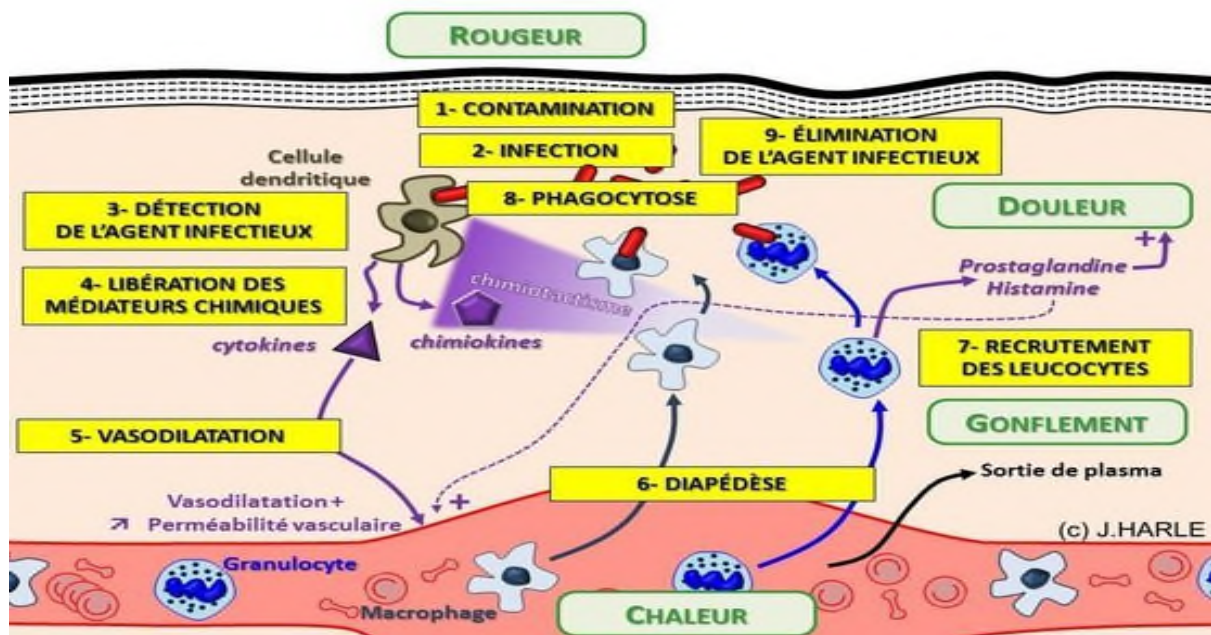


Figure 01 : Médiateurs et événements cellulaires d'une réaction inflammatoire aiguë (Rousselet et al., 2005).

I-1-4- Principales cellules et médiateurs de l'inflammation

Le processus inflammatoire se déroule dans le tissu conjonctif et les principales cellules intervenant dans les différentes phases sont développées dans le tableau II.

Ces cellules vont collaborer les unes avec les autres selon des séquences successives, grâce à la production des médiateurs pro-inflammatoires actifs libérés dans le sang où dans le tissu conjonctif : enzymes, cytokines, immunoglobulines, complément, et de protéines servant de récepteurs (Kumar et al., 2011).

Tableau II : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire (Hautz et al., 2012; Kumar et al., 2012).

| Cellule | Médiateur libéré | Effets |
|--|--|---|
| Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes | Histamine | Augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire. |
| Mastocytes et plaquettes | Sérotonine | Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses. |
| Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales | Facteurs d'activation plaquettaire (PAF) | Vasodilatation, augmentent l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule l'agrégation des plaquettes, induit la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la libération des enzymes lysosomales. |
| Essentiellement par les leucocytes | Prostaglandine | Vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur. |
| Macrophages et les lymphocytes | Cytokines | Elles agissent sur des récepteurs membranaires, elles peuvent être pro-inflammatoires (Interleukines :IL-1 β , IL-6, ou le Tumor Necrosis Factor:TNF α) ou encore anti-inflammatoires (IL-10). Interviennent dans la réparation tissulaire. |
| Essentiellement par les leucocytes | leucotriènes | Augmente la perméabilité vasculaire, induit la libération des enzymes lysosomales et la production des ERO, attire et active les cellules inflammatoires. |
| fibrinogène | Fibrine | Intervient dans la formation du caillot sanguin. |

I-1-5-Radicaux libres (RL) et inflammation

Les RL peuvent stimuler le déclenchement de la réaction inflammatoire en induisant la libération des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et TNF- α qui stimulent le recrutement des neutrophiles et des macrophages. Pour éliminer l'agent pathogène, ces derniers étant actifs libèrent des RL qui entraînent des lésions tissulaires en endommageant les macromolécules et les lipides membranaires ainsi la progression de l'inflammation. Les RL

sont donc un facteur de cause et de conséquence de l'inflammation (Mittal et al., 2014). De plus, ils agissent comme seconds messagers dont :

- Le monoxyde d'azote (NO), produit par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), agit dans la régulation de la vasodilatation ;
- L'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produits par le lysosome, interviennent dans la prolifération des fibroblastes et activent le facteur de transcription Nuclear Factor Kappa B (NFκB) respectivement. De ce fait, le lysosome semble être un organe jouant un rôle crucial dans la régulation du processus inflammatoire (Winrow et al., 1993).

I-2- Lysosome et inflammation

I-2-1- Rôle du lysosome dans l'inflammation

C'est un organe cellulaire de forme vésiculaire sphérique présent dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes mis à part les globules rouges. Le lysosome est riche en enzymes hydrolytiques (les hydrolases) capables de dégrader la majorité des biomolécules, incluant les protéines, les acides nucléiques, les carbohydrates, et les débris cellulaires. Ces hydrolases ne fonctionnent qu'à pH voisin à 4,5 maintenu grâce à une pompe à proton (De Duve, 1983; Boya et al., 2008).

Dans les neutrophiles, suite à l'activation de récepteurs de phagocytose, les lysosomes sont mobilisés. Ils fusionnent alors avec la membrane plasmique des phagosomes. Cette fusion permet de concentrer les hydrolases au contact de la particule à dégrader et ainsi de minimiser les dommages causés au tissu environnant. Dans la majorité des cas, la dégradation fait intervenir la production par la Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oxydase, de dérivés oxygénés toxiques et la libération des protéases et/ou de protéines bactéricides (Van Kessel et al., 2014).

II-2-2- L'impacte de la déstabilisation de la membrane du lysosome sur l'inflammation

Les lysosomes sont fréquemment impliqués dans la genèse d'affections pathologiques, et ce car divers stress tels que les ERO et la phagocytose de molécules cristallines comme la silice, cristaux d'urate ou de cholestérol, peuvent aboutir à une dégradation de la structure de leur membrane qui perd son étanchéité, relâchant ainsi leurs hydrolases soit dans le

cytoplasme et le léser ou à l'extérieur en endommageant les structures extracellulaires (Gicquel *et al.*, 2016).

Des études récentes ont révélé que les cathepsines libérées de cette perturbation telles que les cathepsines B et L peuvent aussi activer l'inflammasome qui est une plateforme multi-protéique activant la sécrétion ainsi que la maturation de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β et IL-18. L'inflammasome Nod Like Receptor familiy, Pyrin domain containing 3 (NLRP3) est le plus étudié car c'est le plus abondant dans les monocytes et macrophages et il est impliqué dans plusieurs pathologies inflammatoires. Il est constitué d'un récepteur NLRP3, une protéine adaptatrice (ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain) et une cystéine protéase (pro-caspase 1). Les cathepsines induisent un changement conformationnel qui activera la partie effectrice de NLRP3. Cette dernière clivera et activera l'enzyme caspase-1 (ou IL-1 convertase), qui à son tour va contribuer par clivage à la maturation des précurseurs pro IL-1 β et pro IL-18 en leurs formes actives et donc leur sécrétion (Figure 2). En effet, ce mécanisme intervient dans plusieurs pathologies inflammatoires notamment dans la maladie de la goutte (Gicquel *et al.*, 2016).

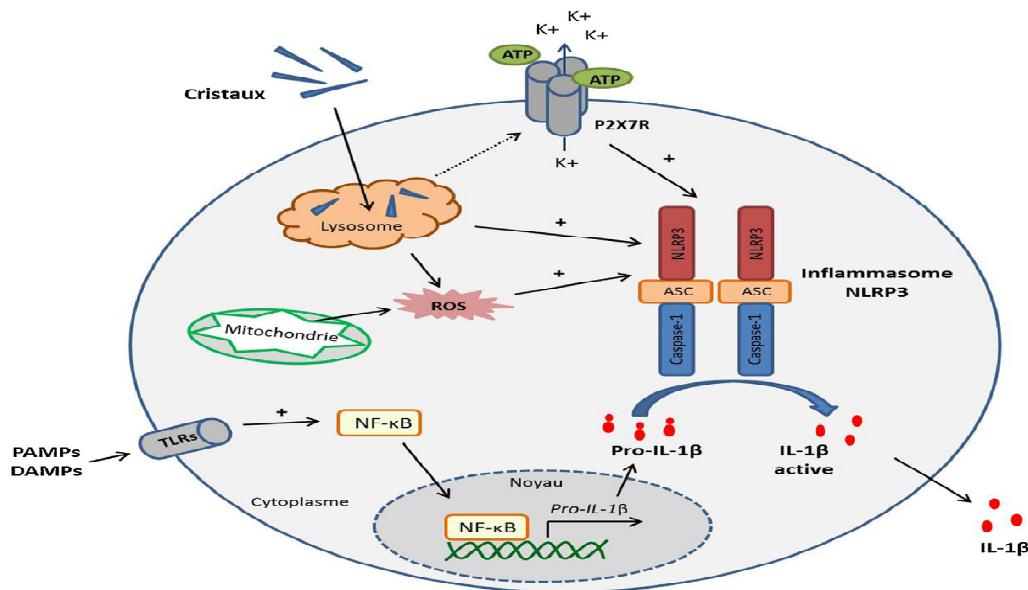


Figure 02: Modèle d'activation de l'inflammasome NLRP3 et libération d'IL-1 β (Gicquel *et al.*, 2016).

Bien qu'une réaction inflammatoire efficace soit importante dans la défense de l'organisme contre plusieurs agressions, cette réponse peut parfois être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation et par anomalie du processus

et des cellules inflammatoires. Plusieurs approches thérapeutiques existent pour réduire ces réponses de longues durées et limiter les complications (Kint et al., 2008).

I-3-Activité anti-inflammatoire

I-3-1-Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS représentent la classe thérapeutique la plus utilisée en raison de leurs propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique et analgésique. Leur mécanisme d'action repose essentiellement sur l'inhibition des COX (figure 03) (Bacchi et al., 2012). Ce qui conduit à la diminution de la production des prostaglandines notamment les PGE2 et PGI2 qui sont des médiateurs importants de l'inflammation (Duganath et al., 2010). Les AINS classiques qui sont non-sélectifs inhibent les deux isoformes de la COX (COX-1 et COX-2), ce qui peut engendrer des effets secondaires parfois graves : l'inhibition des COX-1 induit des dégâts dans le tractus génito-urinaire mais ne présente pas d'effets bénéfiques significatifs. C'est donc l'inhibition de COX-2 qui est responsable de l'effet anti-inflammatoire. Cette découverte a amené à développer une nouvelle génération d'AINS qui inhibent spécifiquement la COX-2 mais des études ont montré que les patients traités avec les nouveaux inhibiteurs de COX-2 ont développé des effets secondaires cardiovasculaires trop importants, c'est pour cela que cette classe n'est utilisée qu'en deuxième ou troisième ligne de traitement (Kint et al., 2008; Bacchi et al., 2012). En plus, les AINS sont doués d'une capacité de stabiliser la membrane lysosomale ce qui constitue leur deuxième mécanisme d'action anti-inflammatoire (Oyedapo et al., 2010).

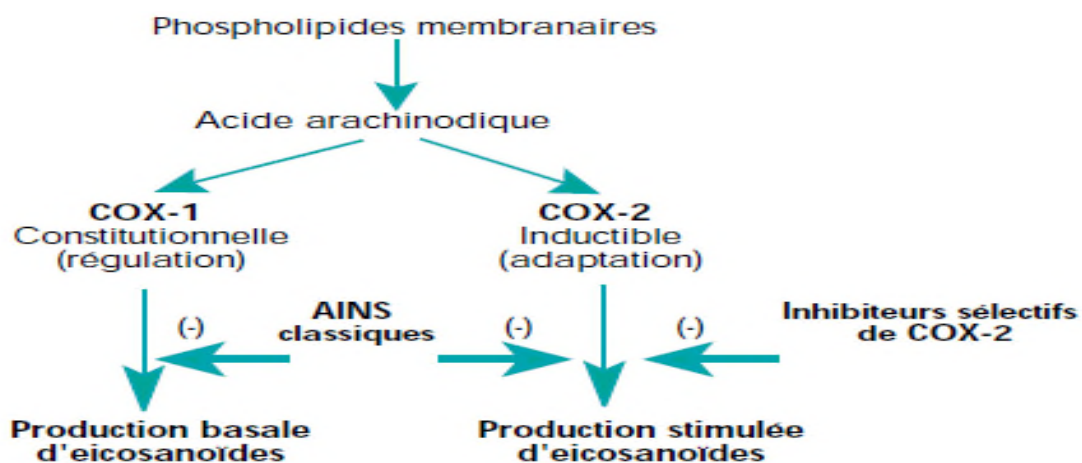


Figure 03 : Théorie des COXs et points d'impact des AINS (Jouzeau et al., 2001).

I-3-2-Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

C'est une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol (principal glucocorticoïde (GC) surrénalien). Dans les tissus cibles, les GC se fixent à leur récepteur cytoplasmique dans la cellule (**Dinh et al., 2014**). Le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux GC provoquant soit l'expression des gènes cibles tels que le gène de la lipocortine qui inhibe la PLA2 et celui de l'inhibiteur de NFκB (IkB) ou l'inhibition d'expression de gènes pro-inflammatoires (**Kint et al., 2008; Bacchi et al., 2012**).

I-3-3-Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes médicinales ont longtemps été utilisées dans la médecine traditionnelle contre diverses inflammations. Il a été montré que cet effet est dû aux métabolites secondaires qui existent dans ces plantes et qui ont plusieurs effets thérapeutiques. On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques entre autres une activité anti-inflammatoire (**Parvin et al., 2015**).

I-3-3-1 Les polyphénols

De nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissent comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation (**Gonzalez-Gallego et al., 2010**). Le tableau III résume les mécanismes d'action des flavonoïdes, des acides phénoliques et des tanins, principaux polyphénols ayant une activité anti-inflammatoire.

Tableau III : Mode d'action anti-inflammatoire des flavonoïdes, acides phénoliques et des tanins (Mota *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2004; Agrawal, 2011; Wen *et al.*, 2012).

| Les flavonoïdes | Les acides phénoliques | Les tanins |
|--|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Inhibition des enzymes intervenant dans le métabolisme de l' AA . ➤ limiter la dégranulation des neutrophiles . ➤ Inhibition de facteur de transcription NFκB en inhibant la phosphorylation de son inhibiteur IK B par une IK B kinase. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Inhiber l'expression de LOX. ➤ Réduction du nombre des leucocytes qui migrent au foyer inflammatoire. ➤ L'acide caféique réduit le taux d'expression de l'acide ribonucléique messenger (ARNm) et de protéine (iNOS) , COX-2 et de TNF-α par inhibition du facteur NFκB. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Inhibition de la libération et migration de cytokines et des leucocytes par formation de complexes avec les macromolécules, les agréger et donc les rendre inactives. ➤ Réparation des tissus par leur propriété cicatrisante. |

I-3-3-2- Les alcaloïdes

Les alcaloïdes exercent leur effet anti-inflammatoire par la diminution de la perméabilité vasculaire et donc le recrutement des leucocytes en inhibant NO, leucotriène, PGE2 et COX (Lopes Souto *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014).

I-3-3-3- Les terpénoides

Les terpénoides sont connus pour leur forte activité antiseptique mais peuvent aussi exercer un effet anti-inflammatoire par leur action inhibitrice sur PLA2, COX-2 et sur LOX comme dans le cas des Caryophyllènes (Franchomme, 2015).

De plus, les métabolites secondaires exercent leur effet anti-inflammatoire d'une part, par piégeage des radicaux libres impliqués dans l'inflammation car ce sont des antioxydants (Helmja *et al.*, 2009), d'autre part, en protégeant la membrane lysosomale de la déstabilisation en limitant la peroxydation des lipides membranaires lysosomaux (Oyedapo *et al.*, 2010)

I-4-*Populus nigra*

I-4-1- Description botanique

Communément appelé Peuplier noir, *Populus nigra* est un grand arbre pouvant atteindre 30 à 35 m de hauteur qui peut vivre jusqu'à 150 ans. C'est une espèce dioïque (présentant des individus de sexe mâle et femelle) qui fleurit au début du printemps (mars-avril). Le tronc du

peuplier possède une écorce brune et plutôt sombre pouvant aller jusqu'à 2 m de diamètre, les feuilles sont denticulées, de forme triangulaire à losangique, les bourgeons sont petits, glabres et visqueux, les fleurs sont de couleur rougeâtre pour les mâles et verte pour les femelles (figure 04) (Siler et al., 2014; Merghache et al., 2016).



A

B

C

D

Figure 04 : Images de différentes parties du peuplier noir :(A) arbre entier (B) Fleurs femelles (C) Fleurs mâles (D) Feuilles et bourgeons (Siler et al., 2014).

C'est une espèce exigeante en sols humides et en lumière que l'on retrouve aussi bien à faible altitude (niveau de la mer) que sur les reliefs. L'aire de répartition du peuplier noir est vaste, elle s'étend à travers l'Europe jusqu'à l'Asie, Asie tempérée et aux côtes de l'Afrique du Nord notamment en Algérie (Elkala, Kabylie et Tlemcen) (Belouad, 2001).

I-4-2- Position dans la systématique

Règne : végétale

Sous règne : Eucaryotes

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Salicales

Famille : Salicacées

Genre : *Populus*

Espèce : *Populus nigra* (Siler et al., 2014).

I-4-3- Usage thérapeutique et activités biologiques des bourgeons de *Populus nigra*

Populus nigra est connu pour ses vertus médicinaux depuis l'antiquité en particulier pour ses propriétés anti-inflammatoires (Dudonné et al., 2011). La partie la plus utilisée en phytothérapie est les bourgeons pour leur richesse en métabolites secondaires. Les principaux composés phénoliques identifiés étaient les acides phénoliques tels que l'acide caféique, p-coumarique, salicylique isoferulique et les flavonoïdes (Siler et al., 2014). Des terpènes ont également été identifiés (Dudonné et al., 2011; Rubiolo et al., 2013).

Au début de notre ère, le médecin grec Galien recommandait déjà l'usage d'une pommade à base de bourgeons de peuplier pour soigner les inflammations cutanées et les hémorroïdes (Siler et al., 2014). Une infusion à la dose de 15 g de bourgeons par litre d'eau a toujours été conseillée contre le rhumatisme, la goutte, la sciatique, les affections urinaires, les bronchites, les dermatoses, l'ulcère et plusieurs inflammations, en raison de leurs propriétés diurétiques, éliminateurs d'acide urique, désinfectant, sudorifiques, tonique et vulnérable (Beloued, 2001).

Les travaux de Dudonné et al. (2011) ont montré que l'extrait aqueux des bourgeons de *Populus nigra* est doté d'une activité antioxydant dose dépendante et d'une activité anti-radicalaire dues à l'acide caféique et p-coumarique identifiés comme les principaux composants antioxydants.

Les travaux de Debbache et al. (2014) ont montré que ce même extrait était plus efficace que les standards utilisés (catéchine et mannitol) dans le piègeage *in vitro* de l' H_2O_2 et la formation du radical hydroxyle (OH) impliqué dans la peroxydation lipidique qui affecte la fluidité des membranes. L'activité antioxydant a aussi été mise en évidence par la méthode de peroxydation de l'acide linoléique induite par le fer. Cette propriété antioxydant contribue dans l'effet anti-inflammatoire que possède cet extrait.

Des études ont aussi montré que les bourgeons du peuplier pouvaient réguler l'expression des gènes impliqués dans la défense antioxydant, la réponse inflammatoire ainsi que le renouvellement cellulaire (Dudonné et al., 2011). Un effet protecteur de la dysfonction endothéliale a aussi été démontré par une étude *in vivo* de Debbache et ses collaborateurs, (2013); cet effet a été expliqué hypothétiquement par la capacité des composés de l'extrait à inhiber l'efflux du calcium. De plus, les bourgeons ont montré une activité antimicrobienne et antifongique (Siler et al., 2014).

II-Matériel et méthodes

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux (AQ) (infusion) et hydro-éthanoliques (HE) des bourgeons du peuplier noir et ce, en testant leur effet protecteur vis-à-vis de la membrane érythrocytaire contre une hémolyse induite par l'hypotonie.

Pour qu'une substance ou un mélange de composés possédant des effets pharmacologiques puisse éventuellement être utilisée comme médicament, il est d'abord nécessaire que l'activité apparaisse à des doses pour lesquelles la toxicité est négligeable. Pour cela la cyto-toxicité des extraits a été testée sur les érythrocytes en déterminant le paramètre libération de l'hémoglobine érythrocytaire.

L'effet protecteur de l'extrait à différentes concentrations sur le modèle choisi a été comparé à deux molécules standards à savoir l'acide caféique (AC) et acide salicylique (AS) qui ont été testées dans les mêmes conditions. Ces standards ont été sélectionnés car ce sont des composés majoritaires dans les bourgeons du peuplier noir, ayant la propriété de puissants anti-inflammatoires (Rubiolo et al., 2013).

La recherche d'une activité antioxydant *in vitro* des extraits à tester permet de mieux expliquer le mécanisme anti-inflammatoire de ces derniers. Des méthodes non enzymatiques ont été sélectionnées à savoir l'activité anti-radicalaire contre le radical ABTS (2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate), le pouvoir chélateur d'ions métalliques ainsi que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique de la membrane érythrocytaire induite par le H₂O₂.

II-1- Matériel

II-1-1-Matériel végétal

La plante utilisée dans cette étude est une plante médicinale connue dans la pharmacopée algérienne *Populus nigra* dont les bourgeons sont bien connus pour leur utilisation traditionnelle en raison de leur pouvoir anti-inflammatoire. La récolte des bourgeons de *Populus nigra* a été effectuée en début du mois de mars 2017 dans la région de Marj Waman (Wilaya de Bejaïa); une région humide et loin de la pollution, ce qui limite les risques de toute modification de la composition biochimique des bourgeons.

II-1-2- Les érythrocytes

Des culots de sang prélevés de personnes saines, non anémiques, n'ayant pas pris d'anti-inflammatoires non stéroïdiens pendant au moins deux semaines avant prélèvement ont été récupérés du laboratoire d'analyse Djama dans des tubes héparinés auxquels des analyses sérologiques ont été faites, et cela afin d'exclure tout risque de contamination d'une quelconque pathologie.

II-1-3-Matériel instrumental et réactifs chimiques

Le matériel utilisé : tubes à hémolyse, balance de précision, vortex, sonicateur, centrifugeuse, broyeur électrique, spectrophotomètre UV-Visible, tamiseuse, rotavapeur, lyophilisateur, lecteur micro plaque.

Les réactifs chimiques utilisés : réactif Folin-Ciocalteu (FC), carbonate de sodium (Na_2CO_3), trichlorure d'Aluminium (AlCl_3), acide gallique, quercétine, bovine serum albumine (BSA), acide acétique, NaCl, NaOH, triéthylamine (TEA), sodium dodecyl sulfate (SDS), trichlorure de fer (FeCl_3), dichlorure de fer (FeCl_2), Chloro-hydrate (HCl), Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , ABTS, Persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), ferrozine, H_2O_2 , CuSO_4 .

II-2- Méthodes et protocoles expérimentaux

II-2-1- Extraction

Après récolte, plusieurs étapes ont été suivies pour obtenir un extrait brut :

➤ Séchage

Les bourgeons du *Populus nigra* ont été séchés à l'étuve à 37°C jusqu'à obtention d'un matériel sec.

➤ Broyage et tamisage

Les bourgeons séchés ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisés jusqu'à l'obtention d'une poudre dont le diamètre est inférieur à 125µm.

II-2-1-1-Extraction hydro-éthanolique

L'extraction des principes actifs de la poudre des bourgeons du peuplier noir est réalisée selon la méthode d'extraction solide-liquide en utilisant un solvant hydro-éthanolique à 70 %

d'éthanol avec un rapport 1 :8 (m/v) (100g de poudre pour 800 ml de solvant). Le mélange est laissé macérer sous agitation à l'abri de la lumière pendant 24h, puis est laissé décanter pendant 24h. Le surnageant est ensuite centrifugé à 1500 tr/ min pendant 15min pour éliminer toute trace de poudre, puis soumis au rotavapeur pour éliminer une grande partie du solvant. Un petit volume est récupéré et congelé à -80°C pour enfin subir une lyophilisation.

II-2-1-2-Infusion

Une masse de 50 g de poudre végétale est mise en contact avec 1000 ml d'eau distillée. Le mélange est laissé macérer pendant 24 h à température ambiante sous agitation continue, puis porté à ébullition pendant une heure. Après refroidissement une filtration est effectuée au papier filtre, le filtrat est alors centrifugé pendant 10 min à 2000 tr/min. Enfin le surnageant est congelé à -80°C et introduit ensuite dans un lyophilisateur jusqu'à obtention d'un lyophilisat sec.

Après extraction le rendement a été calculé pour les deux extraits par la loi suivante :

$$Rd = (m/mi) \times 100$$

Rd : rendement.

m : masse d'extrait brute obtenu.

mi : masse initiale de la poudre végétale.

II-2-2- Analyse phytochimique

II-2-2-1- Dosage des lipides

Une masse de 10 g de poudre végétale est mise en contact avec 100 ml d'hexane pendant 8 h à 100°C, puis le mélange est laissé macérer. Le surnageant est ensuite récupéré dans un ballon pesé au préalable puis soumis au rotavapeur à 40°C jusqu'à l'élimination du solvant. Enfin le ballon a été pesé une seconde fois après évaporation et le pourcentage a été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ de lipide} = ((P_2 - P_1) / mi) \times 100$$

P₁ : poids du ballon vide.

P₂ : poids du ballon après évaporation.

mi : masse initiale de la poudre végétale (**Hyun-II et al., 2013**).

II-2-2-2-Dosage des polyphénols totaux

Principe

Le réactif de FC qui est un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, oxyde les composés phénoliques et leur oxydation donne une couleur bleue, dont l'absorbance reflète la quantité de polyphénols présente dans l'échantillon (Adepado et al., 2009).

Méthode

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué en mélangeant 200 µl d'extrait avec 1000 µl du réactif FC et 800 µl de Na₂CO₃ à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance est mesurée à 760 nm et les quantités sont exprimées en mg équivalent acide gallique par g d'extrait (EAG/g) en utilisant l'acide gallique comme standard. La courbe d'étalonnage utilisant différentes concentrations de ce dernier a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits (Annexe 01) (Adepado et al., 2009).

II-2-2-3-Dosage des flavonoïdes

Principe

Les flavonoïdes forment des complexes avec l'aluminium (Al⁺³) du chlorure d'aluminium, Le complexe ainsi formé absorbe à 430 nm (Zhishen et al., 1999).

Méthode

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits et consiste à ajouter 1 ml d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 min de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g d'extrait (EQ/g) en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine qui a été réalisée dans les mêmes conditions que l'extrait (Annexe 02) (Zhishen et al., 1999).

II-2-2-4-Dosage des tanins totaux

Principe

Les tanins ont la capacité de se complexer avec les protéines et de les précipiter. Après formation du complexe, la protéine est dénaturée pour que les tanins soient libérés, leur absorbance est mesurée à 510 nm (**Hagerman et Butler, 1978**).

Méthode

Le dosage des tannins totaux a été réalisé en utilisant la méthode de Hagerman et Butler, (1978) qui est basée sur la précipitation de la protéine BSA. La quantité des tanins est exprimée en mg équivalent acide tannique par g d'extrait (EAT/g) en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide tannique (Annexe 03) réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits à tester.

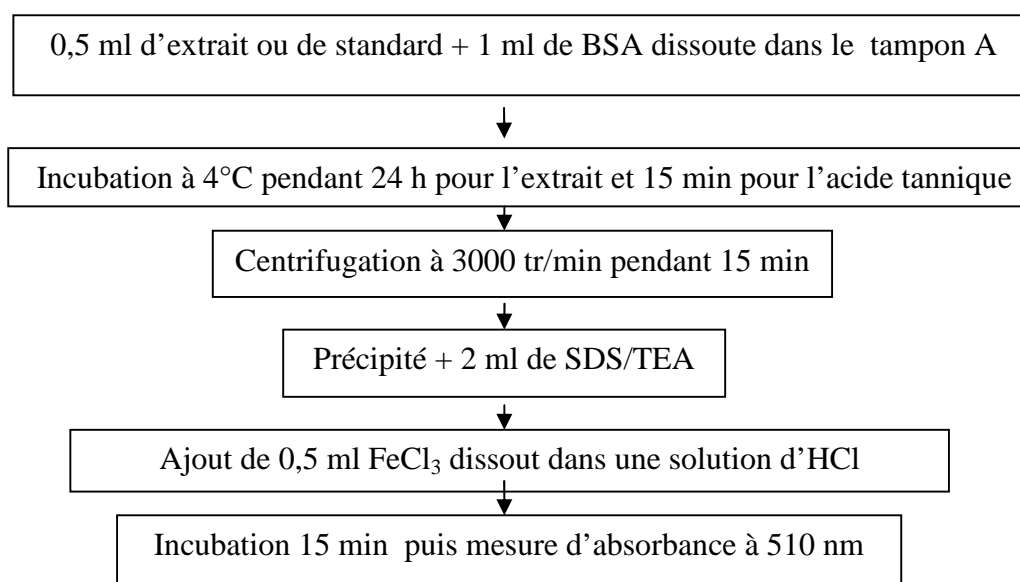


Figure 05 : Schéma résumant le protocole expérimental de dosage des tannins totaux.

Les solutions ont été préparées comme suit :

Tampon A

Une solution d'acide acétique à 0,2 M est ajoutée à 0,17 M de NaCl, le volume est complété jusqu'à 1000 ml avec de l'eau distillée et le pH est ajusté à 4,9 avec une solution NaOH.

SDS/TEA

Le mélange est préparé à partir de TEA à 5 % (v/v) additionné à SDS à 1% (m/v).

FeCl₃

Une masse de 1,62 g de FeCl₃ est dissoute dans 0,01 M de HCl. Le mélange est laissé reposer puis filtré.

II-2-3- Test de cyto-toxicité des extraits hydro-éthanolique et aqueux des bourgeons de *Populus nigra*

Les bourgeons du peuplier noir sont connus comme étant non toxiques, pour le vérifier l'extrait AQ et HE sont testés à différentes concentrations (1, 2, 3 et 4 mg/ml).

Principe

Les globules rouges est l'un des modèles les plus utilisés pour l'étude de la toxicité *in vitro*, vue leur accessibilité et la similitude de la membrane du globule rouge avec celle des autres types cellulaires. En plus de la facilité de révélation de toxicité à l'œil nu puisque si la molécule testée est toxique elle induit forcément une hémolyse libérant ainsi l'hémoglobine qui colore le surnageant en rouge (Tramer et al., 2012).

Méthode

Un volume de 1 ml d'extrait (AQ et HE) à concentrations croissantes (1, 2, 3 et 4 mg/ml) solubilisés dans de l'eau physiologique est ajouté à 1 ml de suspension érythrocytaire. La suspension érythrocytaire a été préparée dans de l'eau physiologique à 10% de sang récupéré dans des tubes EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) ayant subit 3 lavages avec de l'eau physiologique.

Le control négatif est un mélange de 1 ml d'eau physiologique et 1 ml de suspension érythrocytaire. Tandis que le control positif contient 1 ml d'eau distillée et 1 ml de la suspension qui représente le 100% d'hémolyse.

Les tubes sont incubés pendant 10 min à 37°C puis sont mis à centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 min pour une observation macroscopique et mesure d'absorbance du surnageant. Chaque test est répété au moins 3 fois et le résultat est la moyenne des trois mesures parallèles (Tramer et al., 2012). Le pourcentage d'hémolyse est calculé par la loi suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (\text{Abs t} / \text{Abs c}^+) \times 100$$

Abs t : absorbance du test.

Abs c⁺ : absorbance du control positif.

II-2-4- Evaluation de l'activité anti- inflammatoire *in vitro* des extraits de bourgeons de *Populus nigra* par le test de stabilisation de la membrane

Principe

Le lysosome joue un rôle important dans l'inflammation et la déstabilisation de sa membrane peut provoquer ou amplifier une réaction inflammatoire, la protection de cette dernière peut donc être un moyen préventif ou curatif de l'inflammation (Shinde et al.,1999).

Le test d'hémolyse des érythrocytes a longtemps été utilisé pour la forte analogie existante entre la membrane des érythrocytes et celle des lysosomes ; les deux membranes ont une bicouche lipidique riche en protéines (50%) et en oligosaccharides. La stabilisation ou déstabilisation de l'une se traduit forcément par la stabilisation ou déstabilisation de l'autre (Tamil et al., 2012).

Méthode

Le culot du sang récupéré dans des tubes héparinés est soumis à 3 lavages avec 2 volumes de tampon phosphate (PBS) iso-salin (10mM, 154 mM NaCl, pH= 7,4). Après lavage, la suspension érythrocytaire à 10% est préparée dans du PBS iso-salin (Rani et al., 2014).

Pour chaque échantillon, les extraits AQ et HE de bourgeons du peuplier ont été testés à différentes concentrations (0,25 ; 0,5 et 1 mg/ml) contre une hémolyse induite par un choc hypotonique suivant la méthode de Shinde et al. (1999) et Oyepado et al. (2010) dont les détails sont représentés dans le tableau IV. Chaque test a été réalisé en trois répliques. Plusieurs tubes ont donc été préparés:

- Un contrôle négatif qui représente le blanc où aucune hémolyse n'est induite ;
- Un contrôle positif où l'hémolyse est induite par un tampon phosphate hypotonique (10mM, 50mM NaCl, pH= 7,4) qui représente le 100% d'hémolyse ;
- Les tubes standards contenant les molécules pures qui ont été sélectionnées à savoir l'AS et AC aux concentrations de 0,25 et 0,5 mg/ml ;
- Les tubes tests contenant les extraits AQ et HE à différentes concentrations.

Tableau IV : Protocole du test d'hémolyse induite par l'hypotonicité.

| Test | composition |
|-----------------|---|
| Control négatif | <ul style="list-style-type: none">➤ 0,5 ml de la suspension➤ 5 ml de PBS isotonique. |
| Control positif | <ul style="list-style-type: none">➤ 0,5 de la suspension➤ 5 ml de PBS hypotonique. |
| AS | <ul style="list-style-type: none">➤ 0,5 ml de suspension➤ 5 ml de solution d'AS (0,25 et 0,5 mg/ml) solubilisé dans du PBS hypotonique. |
| AC | <ul style="list-style-type: none">➤ 0,5 ml de suspension➤ 5ml de solution d'AC (0,25 et 0,5 mg/ml) solubilisé dans du PBS hypotonique. |
| Extrait HE | <ul style="list-style-type: none">➤ 0,5 ml de suspension➤ 5ml de solution d'extrait HE (0,25 ; 0,5 et 1 mg/ml) solubilisé dans du PBS hypotonique. |
| Extrait AQ | <ul style="list-style-type: none">➤ 0,5 ml de suspension➤ 5ml de solution d'extrait AQ (0,25 ; 0,5 et 1 mg/ml) solubilisé dans du PBS hypotonique. |

Après préparation des tubes, ces derniers ont été incubés pendant 10 min à 37°C puis centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. L'absorbance du surnageant est ensuite mesurée à 540 nm pour doser l'hémoglobine libérée des érythrocytes lysés.

Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est calculé pour chaque échantillon selon la loi suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((\text{Abs1} - \text{Abs2})/\text{Abs1}) \times 100$$

Abs1: absorbance du control positif.

Abs2: absorbance de l'échantillon testé.

II-2-5- Tests de l'activité antioxydant

Etant donné que l'activité anti-inflammatoire est fortement liée à l'activité antioxydant, des tests d'activité antioxydant ont été réalisés.

II-2-5-1- Activité « Scavenger » du radical ABTS

Principe

La formation du radical cation $ABTS^{+\cdot}$ résulte de l'arrachement d'un électron de l'un des atomes d'azote de la molécule ABTS par un oxydant (le persulfate de potassium). En présence d'antioxydants donneurs de protons, ce radical $ABTS^{+\cdot}$ de coloration bleu-vert est réduit en ions $ABTSH^+$ incolore. Le suivi de cette décoloration à 734 nm permet d'évaluer le potentiel anti-radicalaire de l'extrait (Re et al.,1999).

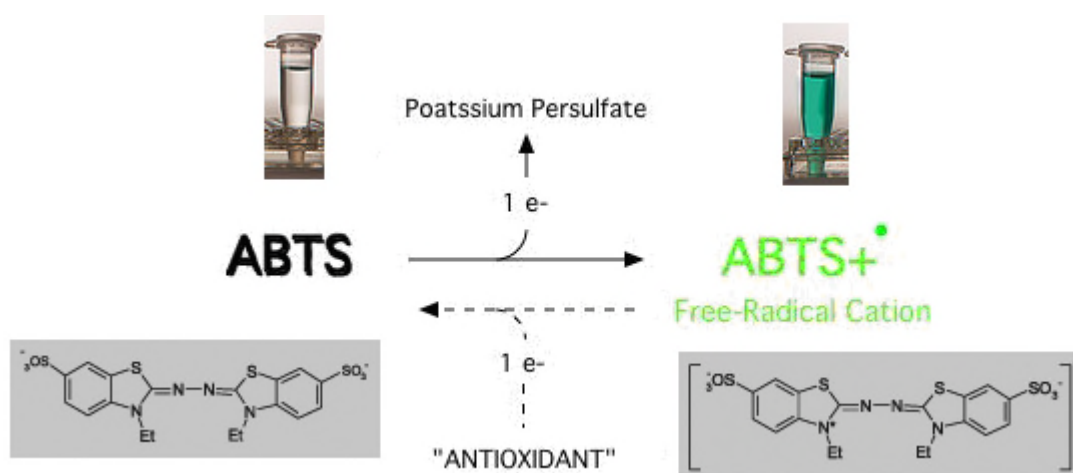


Figure 06 : Processus de réduction du radical $ABTS^{+\cdot}$ en ABTS en présence d'un antioxydant. (Re et al.,1999).

Méthode

Une solution ABTS a été préparée 16h avant le test en mélangeant 7mM d'ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium dans l'eau distillée. A partir de cette solution, des dilutions ont été faites avec de l'éthanol jusqu'à avoir une solution à $0,7 \pm 0,05$ d'absorbance.

Un volume de 20 μ l d'extrait à 100 μ g/ml est ajouté à 180 μ l de la solution ABTS dans des puits d'une micro-plaque. Le mélange est incubé pendant 6 min à l'obscurité puis les absorbances sont mesurées à 734 nm (Re et al.,1999). L'AC et l'AS ont été utilisés comme standards.

Pour déterminer les IC_{50} , différentes concentrations d'extrait ont été testées (1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50, 25 et 10 μ g/ml).

Le pourcentage de réduction du radical ABTS a été calculé par la loi suivante :

$$\% \text{ de réduction} = ((\text{Abs c} - \text{Abs t}) / \text{Abs c}) \times 100$$

Abs c : absorbance du control.

Abs t : absorbance du test.

II-2-5-2- Test de chélation des ions métalliques (fer)

Principe

La chélation du fer ferreux par les extraits est évaluée par la méthode de la ferrozine, cette dernière forme un complexe avec les ions Fe^{2+} libres qui absorbe à 562 nm, la chélation se manifeste par une diminution de l'absorbance lorsque l'agent chélateur rentre en compétition avec la ferrozine (Decker et Welch, 1990).

Méthode

La méthode utilisée est celle de Decker et Welch, (1990). Un volume de 25 μl de FeCl_2 (2mM) et 800 μl d'eau distillée ont été ajoutés à 250 μl d'extraits et standards à différentes concentrations. Après 5 min, 50 μl de ferrozine (5mM) sont ajoutés, le mélange est incubé 5 min avant la lecture des absorbances à 562 nm.

Pour déterminer les IC_{50} , différentes concentrations d'extrait ont été testées (200, 100, 50, 25 et 10 $\mu\text{g/ml}$).

Le pourcentage de chélation du fer est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de chélation} = ((\text{Abs t} - \text{Abs e}) / \text{Abs t}) \times 100$$

Abs t : absorbance du témoin (sans extrait).

Abs e : absorbance de l'échantillon.

II-2-5-3- Test de peroxydation lipidique

Principe

Les radicaux libres sont capables de produire une peroxydation lipidique de la membrane des érythrocytes, la fragiliser et donc induire une hémolyse qui se traduit par une libération d'hémoglobine (Amzal et al., 2008).

Méthode

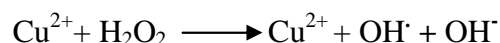
Le protocole de Amzal et al. (2008) a été suivi dans ce test, qui consiste en l'ajout de 100µl de suspension érythrocytaire à 5% dans du PBS (10mM, pH= 7,4), dont le sang est récupéré dans des tubes héparinés, à 50 µl d'extrait (AQ et HE) à différentes concentrations (0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 mg/ml) solubilisé dans du PBS. Après incubation pendant 10 min à 37°C, 50 µl de CuSO₄ (100 µM) et 50 µl de H₂O₂ à 4 mM ont été ajoutés à ce mélange, le tout est ensuite incubé pendant 1h à 37°C, puis dilué avec 3ml de PBS avant lecture des absorbances à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((\text{Abs1} - \text{Abs2})/\text{Abs1}) \times 100$$

Abs1: absorbance du control positif.

Abs2: absorbance de l'échantillon testé.

Le CuSO₄ a été utilisé pour initier la peroxydation des lipides et des protéines membranaires induisant une hémolyse et ce en interagissant avec le H₂O₂ donnant ainsi des ERO selon les réactions suivantes :



II-2-6- l'analyse statistique

Tous les résultats expérimentaux ont été exprimés comme moyenne ± S.E.M ou moyenne ± SD. Les différences entre les groupes ont été déterminées en utilisant le logiciel GraphPad en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test Tukey's. Les différences ont été considérées comme significatives à p< 0,05.

III-Résultats et discussion

Dans cette étude l'effet anti-inflammatoire *in vitro* des bourgeons du peuplier noir a été testé dans le but de valider l'utilisation de ces derniers en médecine traditionnelle. Pour cela, l'extraction est une méthode préliminaire très importante. Le solvant d'extraction est le paramètre qui conditionne le type d'éléments qui vont être extraits. Si le solvant est polaire (comme l'eau), il va extraire les éléments hydrophiles comme: les sels minéraux, les composés ioniques, les composés organiques polaires et les polyphénols. A l'inverse, s'il est apolaire, il va extraire les éléments hydrophobes.

Nous avons opté pour deux extractions de la poudre végétale des bourgeons de *Populus nigra*: une extraction hydro-éthanolique et une infusion. La poudre était d'un diamètre inférieur à 125 µm, ce qui augmente la surface de contact entre la poudre et le solvant permettant ainsi une meilleure libération des principes actifs.

La différence entre les deux solvants réside dans le degré de polarité. L'eau est très polaire, elle va permettre l'attraction des composés polaires, tandis que l'extraction hydro-éthanolique va permettre avec une très grande efficacité de mettre en solution les éléments plus ou moins hydrophobes tels que les tanins, les flavonoïdes, les composés phénoliques, les huiles essentielles. Cela est dû au caractère chimique de l'éthanol qui est un solvant polaire ayant une partie apolaire. Le fait d'ajouter une quantité d'eau va augmenter la polarité du solvant et permettre l'extraction des minéraux de la plante, les sels et la plupart des vitamines hydrophiles (Moure *et al.*, 2000).

III-1- Rendement

Les extraits obtenus avaient une consistance semi-solide plus ou moins visqueux dont l'AQ a donné une couleur marron clair (figure 07) avec un rendement de 25,62 %, tandis que l'HE a donné une couleur plus foncée (figure 08) avec un rendement plus faible qui est de 11,47 %.

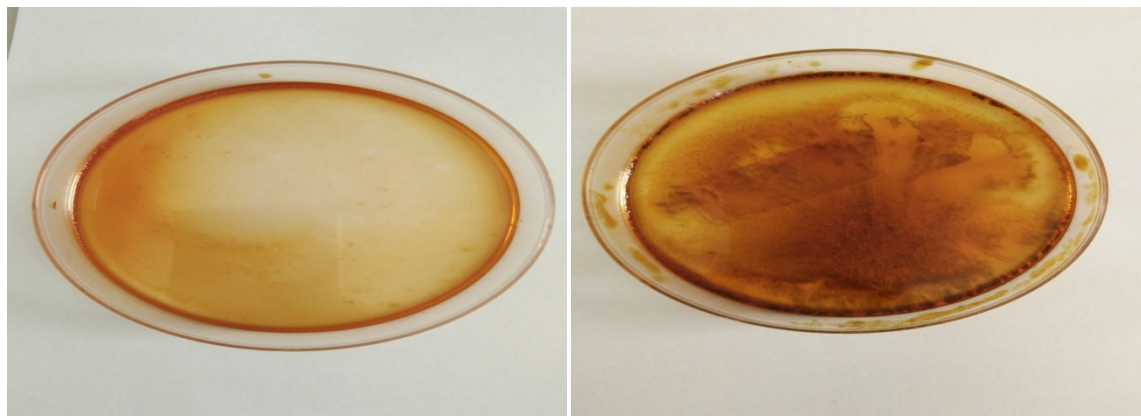


Figure 07 : Image de l'extrait aqueux.

Figure 08 : Image de l'extrait hydro-éthanolique.

Le rendement obtenu avec la méthode de l'infusion (25,62%) est meilleur que celui de l'extraction hydro-éthanolique (11,47%). Cela peut être expliqué par les propriétés du solvant utilisé notamment le degré de polarité, la composition et la structure chimique des composés extraits, la richesse des bourgeons en composés polaires (Nacz et Shahidi., 2004) et par la capacité de l'eau à augmenter la perméabilité des tissus végétaux et la favorisation du phénomène de diffusion de molécules dans l'étape d'extraction (Moure et al., 2000). On peut donc déduire que les bourgeons sont plus riches en composés hydrophiles plutôt qu'en composés hydrophobes.

III-2- Analyse phytochimique

Le profil chimique étant propre à chaque extrait, les applications thérapeutiques qui en découlent sont dépendantes de leur richesse en composés spécifiques, ainsi une analyse préliminaire des lipides, polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux a été entreprise, avant tout test d'activité.

Le pourcentage en lipides estimé par la méthode d'extraction par l'hexane est de 4,7%. D'après l'étude de Hyun-II et al. (2013) sur *Opintia ficus indica* ayant obtenu un pourcentage de $6,12 \pm 0,536\%$, On peut suggérer que les bourgeons du peuplier noir sont riches en lipides.

Les résultats de dosages des polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux des deux extraits AQ et HE sont représentés dans le tableau V.

Tableau V : Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux des deux extraits AQ et HE des bourgeons du peuplier noir.

| | Polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait) | Flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait) | Tanins totaux (mg EAT/g d'extrait) |
|------------|--|------------------------------------|---------------------------------------|
| Extrait HE | 363,45 ± 0,001 | 48,69 ± 0,0005 | traces |
| Extrait AQ | 228,25 ± 0,002 | 42,36 ± 0,004 | traces |

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD

La quantité des polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait. L'extrait HE s'est avéré plus riche en polyphénols avec une teneur de 363,450 ± 0,001 mg EAG/g d'extrait, contre 228,25 ± 0,002 mg EAG/g d'extrait pour l'extrait AQ.

Les flavonoïdes sont quantifiés en mg équivalent de quercétine ; l'extrait HE a enregistré aussi la teneur la plus élevée estimée à 48,69 ± 0,0005 mg EQ/g d'extrait, contre 42,36 ± 0,004 mg EQ/g d'extrait pour l'AQ.

Quant aux tanins, les extraits préparés ont exhibé de faibles quantités (voir traces).

Les résultats exprimés dans le tableau ci-dessus révèlent que l'éthanol à 70% permet une meilleure extraction de ces métabolites secondaires que l'eau. La plupart des travaux traitant des conditions expérimentales optimales lors de l'extraction de polyphénols optent pour une utilisation de solvants mixtes qui se sont montrés particulièrement beaucoup plus efficaces et ce en augmentant leur solubilité dans ces derniers comparés à ceux obtenus par des solvants purs (**Trabelsi et al., 2010**).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Debbache et al. (2014) en termes de proportions (teneurs plus importantes dans l'extrait HE que l'AQ) et d'efficacité d'extraction. Toutefois, ils ont rapporté des teneurs moindres en polyphénols et en flavonoïdes et plus importantes en tanins que ceux obtenus dans les extraits testés. La différence dans la composition en phytochimiques des bourgeons pourrait être liée à plusieurs facteurs. Le facteur déterminant est la méthode d'extraction, il a aussi été rapporté qu'au sein de la même espèce récoltée de la même région et même période, des variations dans la composition peuvent être dues au microclimat, à la composition du sol, à la pluviosité, aux agressions microbiennes et parasitaires, à la lumière (rayons UV), l'âge de l'arbre... (**Dorais et al., 2008**).

III-3- Test de cyto-toxicité

La toxicité des extraits des bourgeons du peuplier noir a été testée sur les érythrocytes et les résultats obtenus sont représentés dans le graphe suivant :

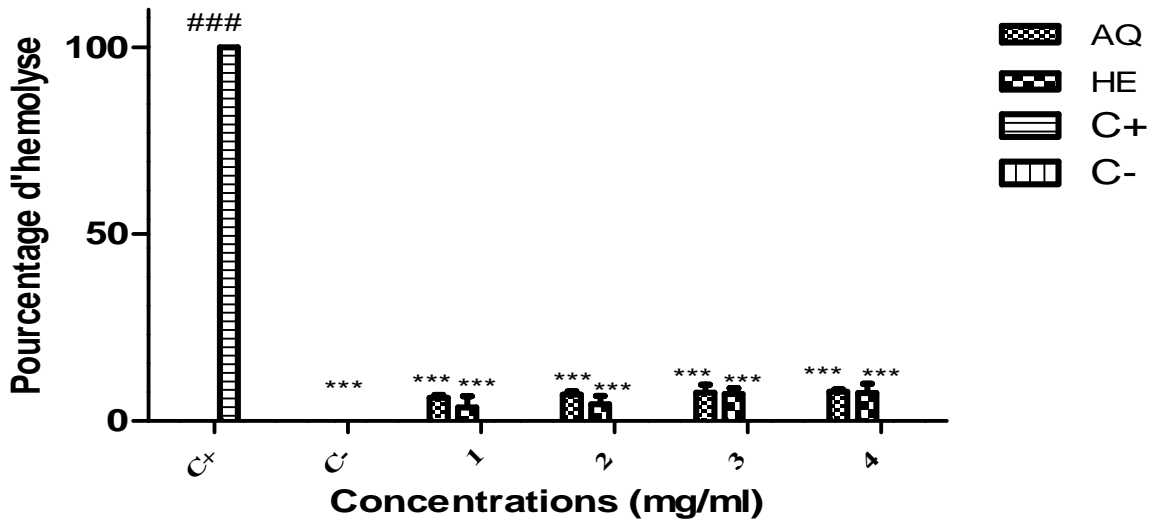


Figure 09 : Test de cyto-toxicité des extraits AQ et HE à différentes concentrations sur les érythrocytes. C+: control positif, C-: control négatif, AQ: extrait aqueux, HE: extrait hydro-éthanolique,. Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM pour n=4. One-way ANOVA suivi par le test de Tukey's ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à *P < 0,05, très significative à **P < 0,01 et très hautement significative à ***P < 0,001 comparé au control positif et elle est significative à #P < 0,05, très significative à ##P < 0,01 et très hautement significative à ###P < 0,001 comparé au control négatif.

Le test de cyto-toxicité *in vitro* réalisé sur les globules rouges humains révèle que le maximum d'hémolyse a été trouvé à la concentration de 4 mg/ml avec un pourcentage de $7,47 \pm 2,43\%$ pour l'extrait HE et $7,80 \pm 0,58 \%$ pour l'extrait AQ. Aucune différence significative n'a été enregistrée entre les pourcentages d'hémolyse à différentes concentrations (1, 2, 3 et 4 mg/ml) et ce, même par rapport au control négatif qui représente le 0% d'hémolyse. Tandis que la différence est très hautement significative pour les deux extraits à toutes les concentrations par rapport au control positif, révélant que les extraits aux concentrations testées ne sont pas toxiques sur le model cellulaire choisi.

L'étude *in vivo* de la toxicité aigüe des bourgeons du peuplier noir réalisée par Debbache et al. (2013) a révélé que l'extrait brut ne présentait aucune toxicité à 200 mg/ kg. De plus, cette plante a été classée par le journal FDA (Food and Drug Administration) parmi les plantes non toxiques (EFSA Journal, 2012). Ce qui valide les résultats obtenus *in vitro*.

III-4- Activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de bourgeons de *Populus nigra*

Le test consiste à soumettre les érythrocytes à une pression osmotique et évaluer l'effet des extraits à protéger ces derniers de l'éclatement. Cette méthode est utilisée pour sa simplicité et la reproductibilité de ses résultats (Oyepado *et al.*, 2010).

Observation macroscopique

Après centrifugation, en comparant à l'œil nu le control positif et négatif, on observe clairement que le control positif est d'une couleur rouge foncée reflétant la libération de l'hémoglobine des globules rouges et un culot plus ou moins claire qui représente les débris cellulaires.

Pour le control négatif, il se forme un culot au fond du tube qui représente les globules rouges intacts et un surnageant transparent révélant l'absence de l'hémoglobine dans la solution (figure10).

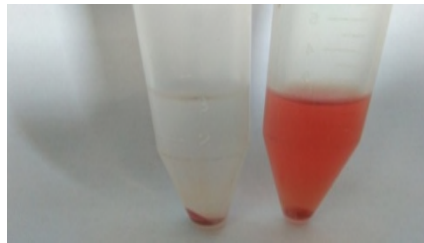


Figure 10 : La différence entre le control négatif (à gauche) et control positif (à droite).

Par contre, on remarque que les échantillons ayant subis un traitement par les extraits HE et AQ ainsi que les standards présentent une couleur de surnageant légèrement plus claire que le control positif, ce qui prouve une inhibition partielle de l'hémolyse (figure 11).

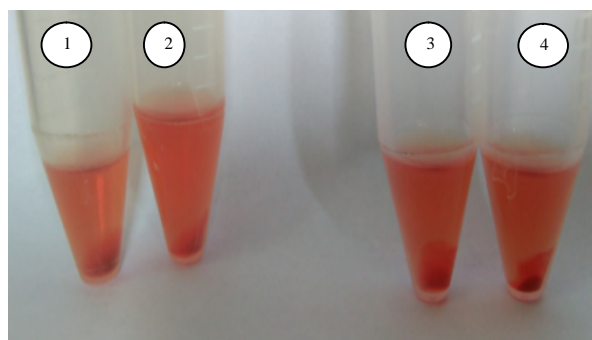


Figure 11 : L'aspect des échantillons traités avec les extraits ainsi que les standards aux concentrations maximales testées 1 : extrait aqueux, 2 : extrait hydro-éthanolique, 3 : acide cafeique, 4 : acide salicylique.

Ces résultats s'accordent avec les pourcentages d'inhibition calculés avec les absorbances obtenues représentés dans le graphe suivant :

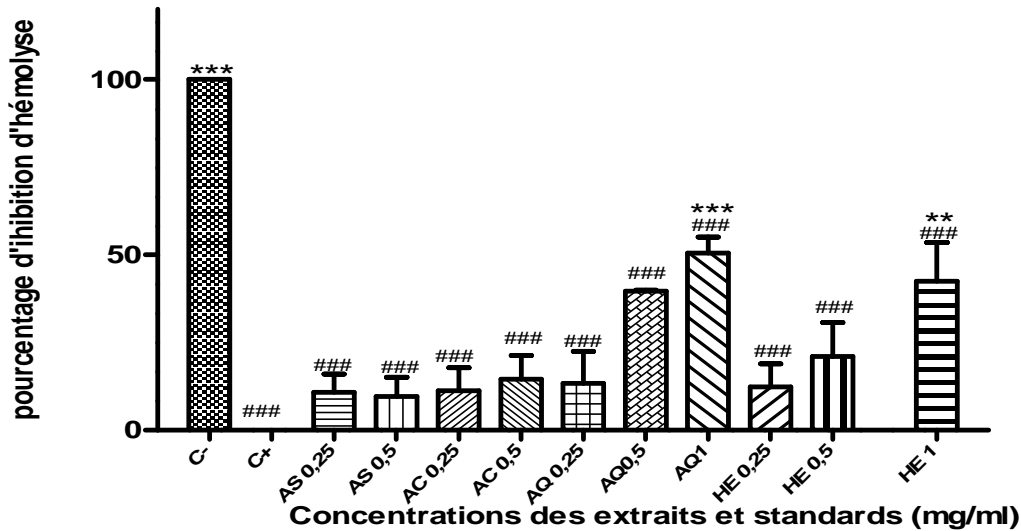


Figure 12 : Activité anti-hémolytique des extraits (AQ et HA) ainsi que des standards (AS et AC) à différentes concentrations. C+ : control positif, C- : control négatif, AQ : extrait aqueux, HE : extrait hydro-éthanolique, AC : acide caféique, AS : acide salicylique. Les pourcentages d'inhibition d'hémolyse sont exprimés en moyenne \pm SEM pour n=4. One-way ANOVA suivi par le test de Tukey's ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à *P < 0,05, très significative à **P < 0,01 et très hautement significative à ***P < 0,001 comparé au control positif et elle est significative à #P < 0,05, très significative à ###P < 0,01 et très hautement significative à ****P < 0,001 comparé au control négatif.

A l'exception des extraits AQ et HE testés à 1mg/ml ayant donné une bonne activité dont la différence est très hautement significative (P<0,001) pour l'AQ et très significative pour l'HE (P<0,01) par rapport au control positif contre l'hémolyse induite par l'hypotonicité avec des pourcentages de $50,47 \pm 4,57$ % et $42,41 \pm 11,09$ % respectivement, toutes les autres concentrations d'extraits ainsi que des standards se sont révélés non efficaces. Les pourcentages des standards (AS et AC) sont respectivement de $9,60 \pm 5,49$ % et $14,52 \pm 6,76$ % à la concentration maximale testée (0,5 mg/ml) ces pourcentages restent statistiquement non significatifs. Les différences très hautement significatives enregistrées entre les différents groupes et le groupe représentant 100% de protection (control négatif) révèlent que les extraits à la concentration de 1 mg/ml a partiellement protégé les érythrocytes de l'hémolyse tandis que les standards ont montré un très faible effet protecteur.

Une étude menée par Umukoro et Ashorobi, (2006) a suggéré que l'extrait de *Eupatorium odoratum* comme protecteur des membranes à un pourcentage d'inhibition (28,13%) en utilisant le même modèle. Ainsi en se basant sur la bibliographie nous pouvons suggérer que

les extraits testés à 1mg/ml pourraient être une source de composés capables de stabiliser les membranes.

Les extraits testés ont présenté des pourcentages d'inhibition plus élevés que ceux des standards, ce qui nous laisse penser à un effet synergique des composés co-existants dans ces extraits.

Le mécanisme exact de la stabilisation de la membrane érythrocytaire n'est pas encore très connu. Cependant la littérature rapporte plusieurs mécanismes hypothétiques dont; Shind et al. (1999) ont proposé que l'extrait peut influencer le rapport volume surface soit en provoquant l'expansion de la membrane érythrocytaire ou en rétrécissant le volume de la cellule et ce en interagissant avec les protéines membranaires. Il est connu que la déformation et le volume cellulaire est fortement lié à la composition intracellulaire en calcium, par conséquent cet effet protecteur peut être dû à la capacité des extraits à altérer l'afflux du calcium dans l'érythrocyte. Il peut aussi être dû à la diminution des électrolytes intracellulaires et à la fluidité des composants.

Umpathy et ses collaborateurs, (2010) ont discuté cet effet par le fait que l'extrait puisse se lier aux composants membranaires surtout les protéines membranaires qui sont en plus grande partie responsables des propriétés physiques de la membrane et qu'ils puissent contribuer à la régulation du volume d'eau intracellulaire par le contrôle des mouvements des ions sodiques et potassiques à travers les canaux protéiques.

Oyepado et al. (2010) ont expliqué l'effet protecteur des érythrocytes contre une éventuelle hémolyse par le fait que la liaison des extraits à la membrane des cellules peut induire une modification subséquente des charges sur la surface membranaire cela peut empêcher l'interaction physique avec les agents d'agrégation ou favoriser une répulsion de charges.

Les molécules responsables de cet effet sont les polyphénols et les flavonoïdes (**Oyepado et al., 2010**) ce qui corrobore les résultats obtenus où des corrélations positives entre leurs concentrations et les pourcentages d'inhibition ont été enregistrées avec des R^2 de l'ordre de 0,9 (Annexes 04, 05, 06 et 07).

III-5- Activité antioxydant

Compte tenu de l'implication du stress oxydatif dans l'inflammation, plusieurs méthodes d'étude de l'activité antioxydant ont été sélectionnées dans le but d'avoir une idée plus

précise sur les mécanismes impliqués dans l'activité anti-inflammatoire. Ainsi, nous avons étudié l'activité anti-radicalaire contre le radical ABTS et le pouvoir chélateur du fer. Un test complémentaire qui est l'inhibition de la peroxydation lipidique a aussi été réalisé.

II-5-1- Activité «Scavenger» du radical ABTS

Le test de décoloration du radical cationique ABTS^{•+} dont le spectre d'absorption maximal est à 734nm est souvent utilisé pour évaluer la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et par conséquent exhiber une activité anti radicalaire (Re et al., 1999), leur effet a d'abord été testé à une concentration de 0,1 mg/ml et les résultats sont représentés dans le graphe suivant :

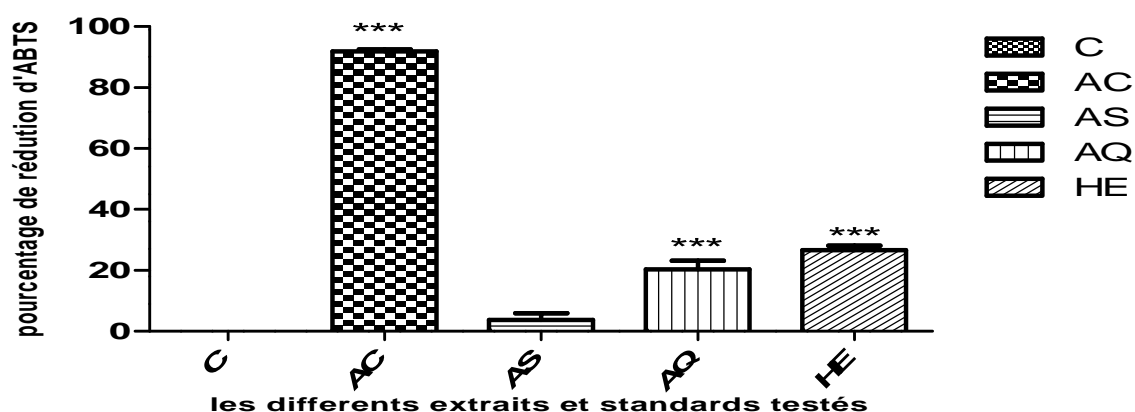


Figure 13 : Activité anti-radicalaire des extraits et standards à une concentration de 0,1 mg/ml. C : control, AQ : extrait aqueux, HE : extrait hydro-éthanolique, AC : acide cafeique, AS : acide salicylique. Les pourcentages de réduction de l'ABTS sont exprimés comme moyenne \pm SD. One-way ANOVA suivi par le test de Tukey's ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à *P < 0,05, très significative à **P < 0,01 et très hautement significative à ***P < 0,001 comparé au control.

A la concentration de 0,1 mg/ml, les extraits AQ et HE ainsi que l'AC ont donné une activité très hautement significative (P<0,001) avec des pourcentages respectifs de 20,25 \pm 2,95%; 26,63 \pm 1,49 %; 91,86 \pm 0,69%. Tandis que l'AS n'a montré aucune activité réductrice significative avec un pourcentage de 3,75 \pm 2,21%. Le pourcentage de réduction enregistré par l'extrait AQ à 0,1 mg/ml est inférieur à celui rapporté par une autre étude (Debbache et al., 2014), ou les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane ont montré des effets de 73,66 \pm 4,26%, IC₅₀= 17,090 μ g/ml et 72,32 \pm 1,98 %, IC₅₀= 14,420 μ g/ml respectivement. La différence est due à la méthode d'extraction sélective utilisée dans l'étude de Debbache et ses collaborateurs, (2014) permettant de diminuer l'encombrement stérique existant au niveau des extraits bruts (Trabelsi et al., 2010).

Les extraits ont été testés à différentes concentrations et les IC₅₀ ont été déterminées (figure14).

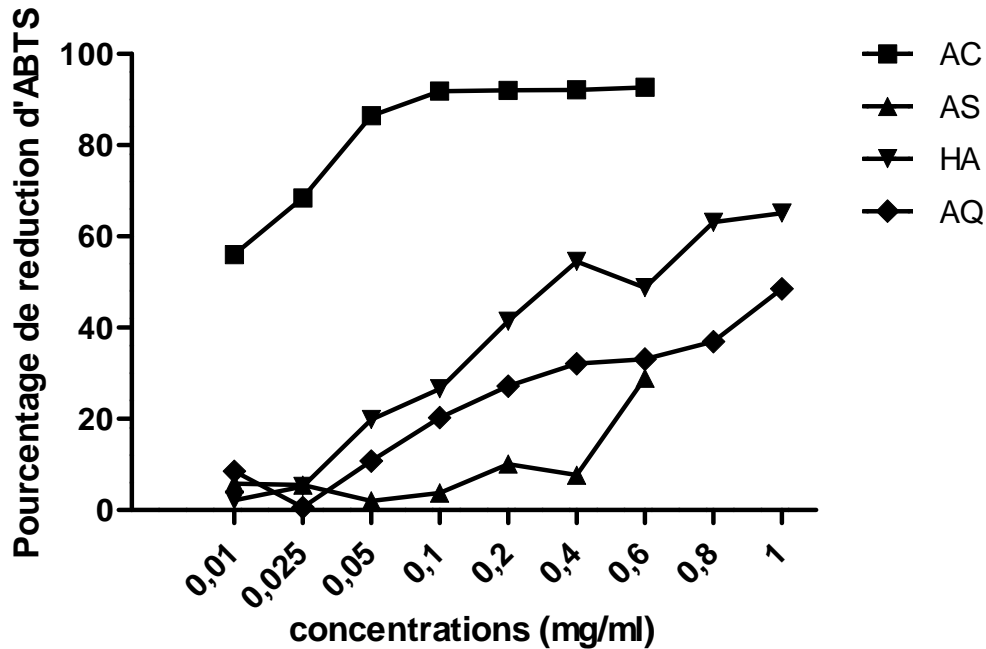


Figure 14 : Activité anti-radicalaire des extraits et standards à différentes concentrations. C : control, AQ : extrait aqueux, HE : extrait hydro-éthanolique, AS : acide salicylique, AC : acide caféique. Les pourcentages de réduction de l'ABTS sont exprimés en moyenne \pm SD. One-way ANOVA suivi par le test de Tukey's ont été utilisés pour l'analyse statistique.

Les IC₅₀ des deux extraits ainsi que les standards sont représentés dans le tableau VI.

Tableau VI : IC₅₀ d'activité anti-radicalaire des extraits HE : hydro-éthanolique, AQ : aqueux et des standards AC : acide caféique, AS : acide salicylique.

| | AC | AS | HE | AQ |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|
| IC ₅₀ (mg/ml) | 0,008 | 1,715 | 0,130 | 0,240 |

On constate que les pourcentages de réduction d'ABTS par les extraits testés sont dose dépendants et qu'en comparant les IC₅₀ et les pourcentages aux concentrations maximales testée, l'AC possède la meilleure activité anti-radicalaire qui est très hautement significative par rapport au control, avec un pourcentage de réduction de $92,69 \pm 0,3$ % et une IC₅₀ de 0,008 mg/ml. L'extrait HE a exhibée une activité très hautement significative avec un pourcentage de $65,13 \pm 11,95\%$ et IC₅₀= 0,130 mg/ml et un pourcentage de réduction pour l'extrait aqueux de $48,58 \pm 3,17$, IC₅₀ de 0,240 mg/ml qui est significatif. Enfin le pouvoir

anti-radicalaire de l'acide salicylique est le plus faible avec une IC_{50} de 1,715 mg/ml et un maximum d'activité à 0,6 mg/ml de $28,95 \pm 0,55\%$.

L'interaction entre l'un des standards ou des extraits avec le radical ABTS permet la diminution de l'absorbance de ce dernier et sa décoloration d'une manière dose dépendante. Ceci peut se traduire par le fait que les extraits et les standards puissent réduire le radical ABTS en lui cédant un atome d'hydrogène ou un électron (figure 06). De ce fait, on peut déduire que les extraits testés peuvent être considérés comme une source d'antioxydants responsables de la réduction du radical ABTS (Re et al., 1999).

Les résultats révèlent que l'activité anti-radicalaire est fortement influencée par la nature du solvant d'extraction où l'extrait HE possède un potentiel anti-radicalaire comparativement à l'extrait aqueux, tout en étant le plus riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes ce qui nous laisse suggérer que les polyphénols et les flavonoïdes sont les composés responsables de cette activité. Cette hypothèse a été confirmée par les coefficients de corrélation qui sont de l'ordre de 0,8 pour l'HE et de 0,9 pour l'AQ obtenus entre les concentrations en polyphénols totaux et en flavonoïdes et l'activité évaluée (Annexes 08, 09, 10 et 11).

II-5-2- Activité chélatrice du fer

La ferrozine forme des complexes avec les ions Fe^{2+} libres. En présence d'autres agents de chélation, la formation du complexe Fe^{2+} -ferrozine est perturbée (Decker et welch., 1990).

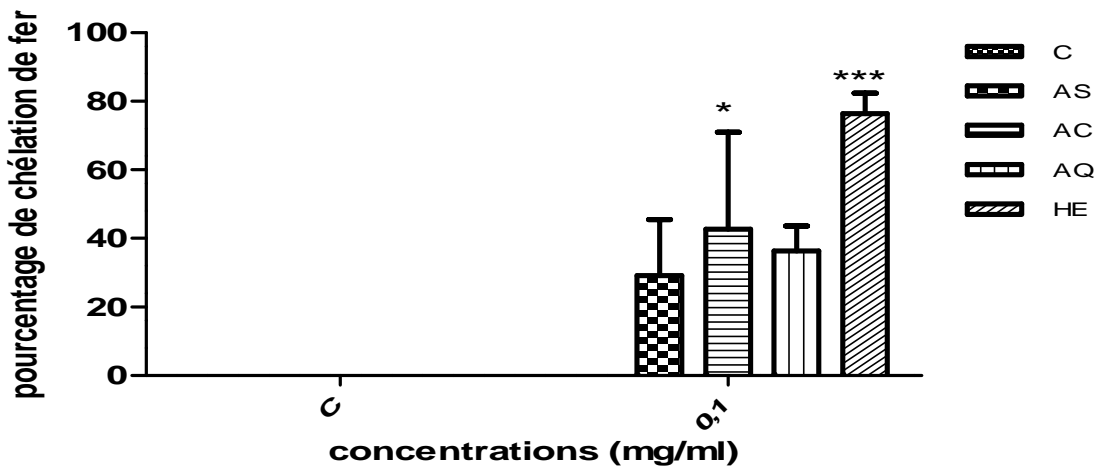


Figure 15 : Activité chélatrice du fer des extraits et standards à une concentration de 0,1 mg/ml. C : control, AQ : extrait aqueux, HE : extrait hydro-éthanolique, AC : acide cafeique, AS : acide salicylique. Les pourcentages de chélation du fer sont exprimés comme moyenne \pm SD. One-way ANOVA suivi par le test de Tukey's ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à * $P < 0,05$, très significative à ** $P < 0,01$ et très hautement significative à *** $P < 0,001$ comparé au control.

A une concentration de 0,1 mg/ml l'extrait HE et l'AC ont efficacement chélaté le fer. Les différents composés (extraits et standards) ont été testés à 0,2 mg/ml, et les résultats obtenus ont montré une diminution de l'activité chélatrice du fer. Ainsi, il a été décidé de tester les extraits à des concentrations inférieures et les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous.

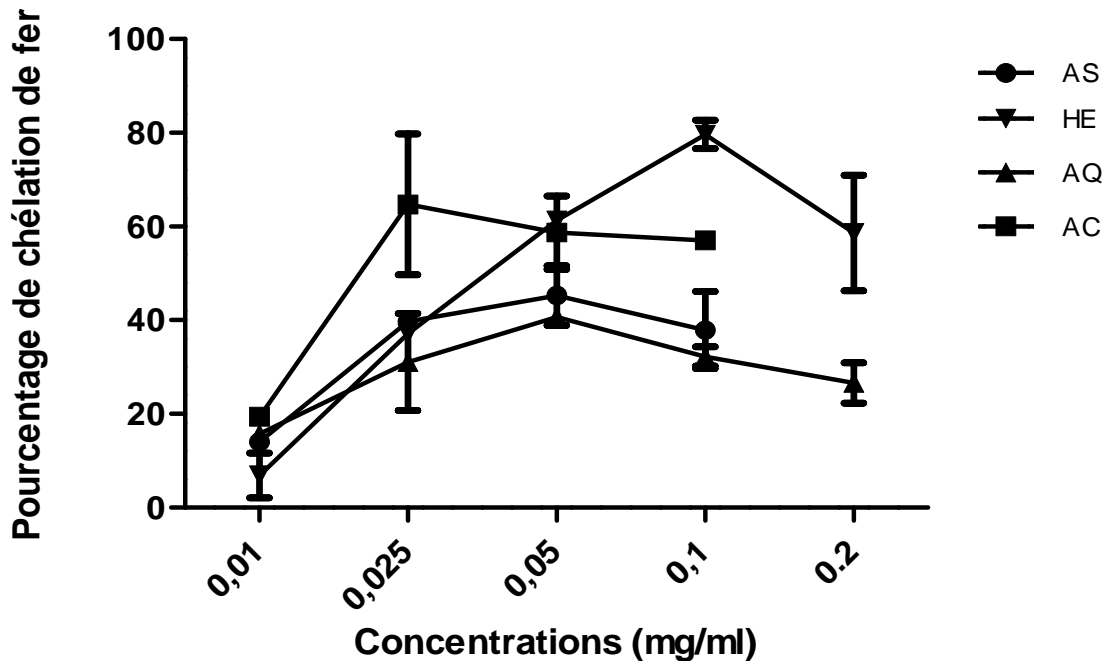


Figure 16 : Activité chélatrice du fer des extraits et standards à différentes concentrations. C : control, AQ : extrait aqueux, HE : extrait hydro-éthanolique, AC : acide caféique, AS : acide salicylique. Les pourcentages de chélation du fer sont exprimés comme moyenne \pm SD. One-way ANOVA suivi par le test de Tukey's ont été utilisés pour l'analyse statistique.

Le profil de l'activité chélatrice du fer révèle que l'effet des standards et des extraits n'est pas dose dépendant. L'extrait HE présente une activité chélatrice très hautement significative ($P < 0,001$) par rapport au contrôle avec un pourcentage maximal de $79,63 \pm 3,04$ % à 0,1 mg/ml ($IC_{50} = 0,024$ mg/ml). Cet effet est significativement plus élevé ($P < 0,05$) que les standards. L'AC testé dans les mêmes conditions a exhibé un effet significatif ($P < 0,05$) comparativement au contrôle avec un pourcentage de $64,73 \pm 15,06$ % à 0,025 mg/ml ($IC_{50} = 0,212$ mg/ml). Tandis que l'activité de l'AS a montré un pourcentage maximal de $45,25 \pm 6,39$ % à 0,05 mg/ml ($IC_{50} = 0,208$ mg/ml), contrairement à l'extrait aqueux qui ne présente aucune activité significative avec un pourcentage de $40,72 \pm 0,62$ % à 0,05 mg/ml ($IC_{50} = 0,022$ mg/ml).

Les ions Fe^{2+} sont des pro-oxydants puissants à cause de leur réactivité élevée. Ces ions sont des cofacteurs de la réaction de Fenton génératrice de radicaux OH^{\cdot} qui sont responsables

de la peroxydation des lipides. La chélation des ions métalliques mène à bloquer la réaction de Fenton ce qui empêche la peroxydation lipidique.

On remarque que pour les extraits et les standards, il existe une concentration optimale à laquelle la chélation est maximale. Cela peut être expliqué par la nature des chélatants qui sont les composés présents dans les extraits et ayant des affinités différentes pour le fer, en compétition avec la Ferrozine (**Kolayli et al., 2004**).

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent de bons chélateurs des ions métalliques. Cependant cette capacité dépend de quelques paramètres tels que le type du noyau (noyau catéchol chélate mieux qu'un noyau phénol) et la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés (**Chobot et al., 2015**). Cela est en accord avec les résultats obtenus dans ce travail. Il a été remarqué que l'activité chélatrice diminue ce qui s'expliquerait par l'encombrement stérique qui induit le masquage des motifs structuraux et des groupements fonctionnels nécessaires pour cette activité, empêchant la fixation des ions de fer. De plus, les travaux de Chobot et al. (2015) ont montré que l'acide caféique est un initiateur efficace de l'autoxydation d'ion Fe^{2+} en Fe^{3+} moins réactif.

La faible activité chélatrice de l'extrait AQ peut être expliquée par la polarité élevée de ses composés ce qui les rend plus susceptibles de créer des répulsions et des encombrements stériques.

II-5-3- Test de peroxydation lipidique

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydatif en raison de la richesse de leur membrane en acides gras polyinsaturés, ce qui rend ces cellules très susceptibles aux dommages oxydatifs (**Amzal et al., 2008**).

Ce test consiste à soumettre les érythrocytes à une agression radicalaire en mettant en réaction l' H_2O_2 avec le $CuSO_4$ qui produit l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle OH^\cdot qui est le radical le plus actif par l'attaque des lipides polyinsaturés entraînant la fragilisation de la membrane et donc l'hémolyse, libérant ainsi les constituants intracellulaires entre autres l'hémoglobine qui est dans ce cas le révélateur de peroxydation lipidique au point d'hémolyse (**Amzal et al., 2008**).

Les résultats de l'activité des extraits (HE et AQ) contre la peroxydation lipidique sont représentés dans le graphe suivant sous forme de pourcentages d'inhibition d'hémolyse.

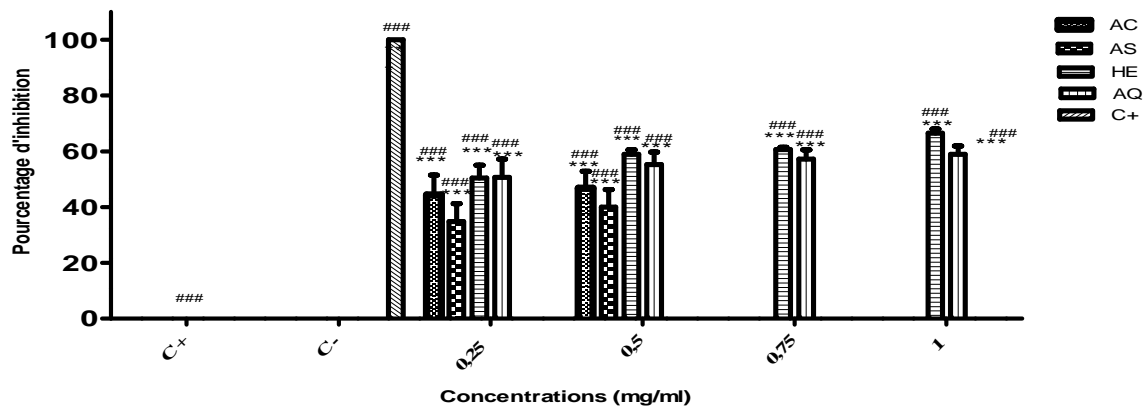


Figure 17: Effet anti-péroxydation lipidique des extraits ainsi que des standards à différentes concentrations. C+: control positif, C- : control négatif, AQ : extrait aqueux, HE : extrait hydro-éthanolique, AC : acide caféique, AS : acide salicylique. Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation sont exprimés en moyenne \pm SEM pour n=4. One-way ANOVA suivi par le test de Tukey's ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative à *P < 0.05, très significative à **P < 0.01 et très hautement significative à ***P < 0.001 comparé au control positif et elle est significative à #P < 0,05, très significative à ##P < 0,01 et très hautement significative à ###P < 0,001 comparé au control négatif..

Il en ressort que les extraits (AQ et HE) testés à 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 mg/ml ainsi que les standards (AS et AC) à 0,25 et 0,5 mg/ml ont protégé d'une manière très hautement significative (P<0,001) contre l'attaque radicalaire des radicaux produits par la réaction de fenton, avec des pourcentages maximaux de $58,97 \pm 2,91\%$, $66,55 \pm 1,49\%$, $39,91 \pm 6,32\%$ et $46,79 \pm 6,06\%$ respectivement aux concentrations maximales testées en comparant au control positif dont les érythrocytes n'ont subis aucun traitement.

Les pourcentages d'inhibition de peroxydation lipidique des extraits et des standards à toutes les concentrations sont aussi très hautement significatifs par rapport au control négatif.

Il a été constaté que les pourcentages d'inhibition d'hémolyse varient en fonction de la concentration, cette variation est statistiquement non significative, par conséquent l'activité n'est pas dose dépendante pour les composés testés (extraits et standards).

Les résultats obtenus sont soutenus par les travaux de Warnant et al. (2004) qui ont rapporté une bonne activité inhibitrice du genre *Populus* contre la peroxydation lipidique de l'acide linoléique et l'espèce *Populus nigra* a exhibé la meilleure activité.

L'inhibition de la peroxydation lipidique peut s'exercer aux différentes étapes de cette dernière, soit par l'inhibition ou le ralentissement de l'initiation et ce par la décomposition du H_2O_2 , la chélation du Cu^{2+} , le piégeage de l'anion superoxyde et le radical hydroxyle qui sont les produits de la réaction entre $CuSO_4$ et H_2O_2 . L'action des phytochimiques présentes dans

les extraits pourrait avoir lieu au niveau des étapes de la prolongation et la terminaison de la peroxydation des lipides, inhibant ainsi la réaction en chaîne. Les composés actifs des extraits testés pourraient agir selon l'un ou par la combinaison de tous ses mécanismes. Des molécules telles que les polyphénols et les flavonoïdes ont été rapportés comme inhibiteurs potentiels de la peroxydation lipidique (**Amzal et al., 2008**).

Le blocage ou ralentissement de la peroxydation lipidique peuvent être exercés par les activités testés dans ce travail (l'activité anti-radicalaire et l'activité chélatrice du fer). Etant donné que les extraits et standards testés ont présenté une bonne activité anti-radicalaire de l'ABTS par leur capacité de donner un atome d'hydrogène ou un électron, de même ils peuvent interférer avec la réaction du H_2O_2 et $CuSO_4$, ainsi le transformer en une molécule de H_2O inoffensive.

De plus, les composés des extraits à travers leur activité chélatrice du fer montrée dans cette étude, pourraient chélater le Cu^{2+} et inhiber la réaction entre $CuSO_4$ et H_2O_2 et par conséquent inhiber la formation de l'hydroxyle, un radical hautement réactif par rapport à l'anion superoxyde qui est très peu réactif car il ne traverse pas la membrane cellulaire. La chélation des ions métalliques peut inhiber tous les processus métallo-dépendants (**Finkel et al., 1998**).

Les acides phénoliques contenus dans les extraits ont la capacité de donner des électrons ce qui accélèrent la transformation de H_2O_2 en une molécule d' H_2O (**Cillard et Cillard, 2006**).

Il est connu que les flavonoïdes sont doués d'une activité inhibitrice de la peroxydation lipidique par le piégeage de l'anion superoxyde, chélation de métaux et capacité de donner un atome d'hydrogène et ce grâce à leur structure et leurs groupements fonctionnels favorisant cette activité entre autres : les groupements hydroxyles, les doubles liaisons, les hydrogénations.... (**Cillard et Cillard, 2006**).

Les extraits testés sont riches en flavonoïdes et en polyphénols, leur activité peut être attribuée à ces molécules, ce qui est bien argumenté par les coefficients de corrélation obtenus qui sont de l'ordre de 0,9 entre l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et la teneur en polyphénols et flavonoïdes (Annexes 12, 13, 14 et 15).

Discussion générale

Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire des bourgeons de *P. nigra*. La sélection de cette partie n'était pas arbitraire mais suite à une combinaison de plusieurs critères, c'est la partie la plus utilisée en médecine traditionnelle. De plus, les bourgeons d'une plante contiennent toutes les cellules et les composants de la future plante. Ils sont plus actifs et plus bénéfiques que les plantes matures car ils concentrent les principes actifs présents dans chaque partie du végétal par conséquent ses effets réunissent les propriétés de la plante entière, en plus des phytohormones de croissance qui sont absentes dans la plante mature.

L'extraction réalisée selon deux méthodes standards a donné des extraits d'un aspect visqueux, ce qui nous a mené à doser le taux de lipides contenu dans ces bourgeons, Les résultats ont montré un pourcentage de 4,7 qui d'après la bibliographie est assez important. La présence des sucres n'est pas négligeable dans ce cas.

Le test de l'activité anti-hémolytique a montré que l'extrait aqueux est plus actif que l'extrait hydro-éthanolique. Tous les mécanismes qui peuvent intervenir mettent en jeu les charges, ce qui nous laisse suggérer que les bourgeons sont plus riches en composés polaires expliquant ainsi le rendement plus élevé dans ce dernier.

L'effet synergique des composés phytochimiques présents dans les bourgeons pourrait expliquer le potentiel anti-hémolytique des extraits bruts.

Contrairement aux résultats obtenus dans le test de l'hypotonie, l'activité anti-radicalaire maximale du radical ABTS a été obtenue avec l'acide caféique qui est un acide phénolique pur très puissant, suivi de l'extrait HE qui a enregistré une IC_{50} plus importante que l'extrait aqueux, cette activité est dépendante du taux des polyphénols dans les deux extraits. Quant à l'acide salicylique ayant exhibé une faible activité, cela pourrait s'expliquer par son insolubilité dans le milieu utilisé.

Il a été constaté que l'activité chélatrice du fer ne corrèle pas avec l'activité anti-radicalaire, en effet un antioxydant peut très bien répondre à une activité et pas une autre, ceci dépend des groupements qu'il possède (**Chobot et al., 2015**).

Les extraits et les standards ont donné une très bonne activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et ce à travers plusieurs mécanismes qui ont eu lieu au niveau de l'initiation et/ou de

la propagation. Des corrélations positives ont été enregistrées entre le taux des polyphénols et l'activité testée. Ce qui nous laisse suggérer que ces phytochimiques sont responsables de l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (**Cillard et Cillard, 2006**).

La protection des érythrocytes du choc hypotonique ainsi que de l'attaque radicalaire indique que les extraits testés pourraient à travers un mécanisme comparable protéger les membranes des lysosomes et inhiber ainsi la libération de leurs contenus responsables de l'amplification de l'inflammation. De plus, des travaux antérieurs ont montré que les polyphénols et flavonoïdes dont les extraits sont riches exercent un effet de stabilisation membranaire du lysosome en liant les cations (**Oyepado et al., 2010**).

Les résultats de cette étude fournissent des preuves susceptibles de soutenir l'utilisation traditionnelle des bourgeons du peuplier noir dans le control de l'inflammation, l'un des mécanismes anti-inflammatoires pouvant être attribué à ces bourgeons est leur pouvoir stabilisateur de la membrane lysosomale contre une quelconque agression, en plus de leur importante activité antioxydant.

Conclusion

Dans ce travail, le potentiel anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux et hydro-éthanoliques préparés à partir des bourgeons du *Populus nigra* a été évalué. Pour cela, deux modèles d'étude ont été sélectionnés, le test de la stabilisation de la membrane des érythrocytes et le test antioxydant.

L'analyse phytochimique a révélé que l'extrait hydro-éthanolique était riche en polyphénols et flavonoïdes comparativement au lyophilisat de l'infusion, tandis que des niveaux très faibles en tanins ont été enregistrés au niveau des deux extraits.

Les composés bioactifs présents dans les deux extraits ont exhibé une importante activité stabilisatrice de la membrane des érythrocytes avec une meilleure efficacité au niveau de l'extrait aqueux. Ces activités sont supérieures à celles exhibées par les standards.

Le potentiel antioxydant à savoir anti-radicalaire, inhibiteur de la peroxydation lipidique et chélateur du fer des extraits testés serait en partie dû à l'activité synergique des phytochimiques présents dans ces derniers.

Le modèle étudié permet de suggérer le rôle anti-inflammatoire de l'extrait de bourgeons de *Populus nigra* à travers la stabilisation de la membrane des lysosomes.

L'absence de composés toxiques dans les bourgeons du peuplier noir, nous permet de proposer ces derniers comme sources de composés utilisés dans plusieurs domaines d'application :

- En cosmétologie naturelle, les bourgeons sont une source potentielle d'antioxydants.
- En biotechnologie, comme additif alimentaire capable d'inhiber l'oxydation des biomolécules.
- En industrie pharmaceutique pour traiter et prévenir les maladies à caractère inflammatoires.

Références bibliographiques

Adedapo, A.A., Jimoh, F.O., Koduru, S., Masika, P.J., Afolayan, A.J. (2009). Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9: 21.

Agrawal, A.D. (2011). Pharmacological activities of flavonoids. *International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology*. 4(2): 1394-1397.

Amzal, H., Alaoui, K., Tok, S., Errachidi, A., Charof, R., Cherrah, Y., Benjaouad, A. (2008). Protective effect of saponins from *Argania spinosa* against free radical-induced oxidative haemolysis. *Fitoterapia*. 79(5): 337-344.

Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., Coppolino, M.F. (2012). Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*. 11: 52-64.

Belouad, A. (2001). Plantes médicinales d'Algérie. Edition *Office des Publications Universitaires*. p : 162-163.

Boya, P., Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 27: 6434–6451.

Chobot, V., Hadacek, F., and Kubicova, L.(2015). Effects of Selected Dietary Secondary Metabolites on Reactive Oxygen Species Production Caused by Iron (II) Autoxidation. *Molecules*. 19(12): 20023–20033.

Cillard, J., Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*. 13 (1): 24-29.

De Duve C. (1983). Lysosomes revisited. *European Journal of Biochemistry*. 13: 391-397.

Debbache, N., Atmani-Kilani, D., Schini-Keirth, V.B., Djebbli, N., Atmani, D. (2013). Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, antiinflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(9): 697-704.

Debbache-Benaida, N., Atmani-Kilani, D., Atmani, D.(2014).Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*,flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Industrial Crops and Products*. 53: 85– 92.

Decker, E.A., Welch, B.(1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38 (3): 674–677.

Dinh, Q.N., Drummond, G.R., Sobey, CG., Chrissobolis, S. (2014).Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. *BioMed Research International*.2014: 1-7.

- Dudonné, S., Poupard, P., Philippe, C., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J.M., Vitrac, X. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 4527–4536.
- Duganath, N., Rubesh-Kumar, S., Kumanan, R., Jayaveera, K.N. (2010). Evaluation of anti-denaturation property and anti-oxidant activity of traditionally used medicinal plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 1(2): 1-6.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2012). Parma, Italy EFSA Journal 10(5): 2663.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O. H., Andersen, P. S., Girardin, S. E. (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical and Experimental Immunology*. 147(2): 227–235.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 10: 248-253.
- Franchomme, P. (2015). La science des huiles essentielles médicinales. Édition Guy Trédaniel. P : 411-412.
- Gicquel, T., Robert, S., Victon, T., Lagente, V. (2016). L'inflammasome NLRP3 : physiopathologie et application thérapeutique. *La presse Medicale*. 2991 :1-6.
- Gonzalez-Gallego, J., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Tunon, M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*. 104: 15–27.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A., Koopmans, S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 6(11): 1045–1056.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26: 809-812.
- Hautz, T., Wolfram, D., Grahammer, J., Starzl, R., Krapf, C., Pratschke, J., Andrew, W.P., Brandacher, G., Schneeberger, S. (2012). Mechanisms and mediators of inflammation: potential models for skin rejection and targeted therapy in vascularized composite allotransplantation. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012: 1-9.
- Helmja, K., Vaher, M., Pussa, T., Kaljurand, M. (2009). Analysis of the stable free radical scavenging capability of artificial polyphenol mixtures and plant extracts by capillary electrophoresis and liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 1216: 2417-2423.
- Heriberto, L.J.R., Lee, J., Michael, G., Kartik, C., Felipe, D., Michael, P.L., Jürgen, B. (2013) Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death. *Cell Cycle*. 12(12): 1868-1878.
- Huang, X., Li, B., Shen, L. (2014). Studies on the anti-inflammatory effect and its mechanisms of sophoridine. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 10: 1155 -1161.
- Hyun-Il, J., Mi-Na, C., Eun-In Y., Dong, G.C., Young-Soo, K. (2013). Physicochemical properties and antioxidant activity of Korean cactus (*Opuntia humifusa*) cladodes. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 54(3): 288–295.

Jouzeau, J.Y., Blain, H., Daouphars, M., Gillet, P. (2001). L'inhibition sélective de la cyclo-oxygénase de type 2 : une nouvelle vision des anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités thérapeutiques*. 6(2): 92-96.

Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (1996). Flavonoids, potential anti-inflammatory agents. *Natural Product Sciences*. 2(1): 1-8.

Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*. (96): 229-245.

Kint, J.T., Goldsby, A.R., Osborne, A.B.(2008). Immunologie. 6eme edition. p: 340-360.

Kolayli, S., Ocak, M., Kucuk, M., Abbasoglu, R. (2004). Does caffeine bind to metal ions. *Food Chemistry*. 84: 383-388.

Kumar, V., Bhat, Z.A., Kumar, D., Bohra, P., Sheela, S. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Basella Alba* linn. Var. Alba. *International Journal of Drug Development & Research*. 3(2):176-179.

Kumar, V., Bhat, Z.A., Kumar, D., Khan, N.A., Chashoo, I.A. (2012). Evaluation of anti-inflammatory potential of leaf extracts of *Skimmia anquetilia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(8): 627-630.

Lopes Souto, A., Tavares, J.F., Sobral da Silva, M., Formiga Melo Diniz, M.F., Filgueiras de Athayde-Filho, P., Barbosa Filho, J.M. (2011). Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. *Molecules*. 16: 8515-8534.

Merghache, D., Boucherit-Otmani, Z., El Haci, I., Merghache, S., Chikhi, I., Boucherit, K. (2016). Antioxidants and antimicrobial activities of Algerian *Populus nigra* buds extracts. *Bioscience & Engineering Journal*. 3(1/2): 3201- 3209.

Min, R.K., Kim, Y., Kang, S.H., Mar, W., Lee, K.S., Ro, J.S., Lee, S.H., Kim Y.(1996). Inhibitory effects of herbal extracts on cyclooxygenase activity of prostaglandin H2 synthase from sheep seminal vesicle. *Natural Product Sciences*. 2(1):56-74.

Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, P.S., Asrar B.M. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20(7): 1126–1167.

Mota, M.I.R., Thomas, G., Barbosa, F.(1985). Anti-inflammatory and analgesic Activity of *Anacardium Occidentale* Leaf Extracts *J.M.J. Ethnopharmacology*. 13(3): 289.

Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Lema, J.M. (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3890-3997.

Naczka, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 1054: 95-111.

Organisation mondiale de la Santé (OMS). (2003). Rapport sur la santé dans le monde.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Oyedapo, O.O., Akinpelu, B.A., Akinwunmi, K.F., Adeyinka, M.O., Sipeolu, F.O. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2(4): 46-51.
- Parvin, S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M.A., Nahar, L., Ekramul, M.D. (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *Bio Med Central Res Notes*. 8: 412:1-7.
- Pousset, J.L., Bourn, B., Cave, A. (1981). Action Antihémolytique du Xylitol Isolé des Ecorces de Carica papaya. *Journal of Medicinal plant Reseath*. 41:40-47.
- Punchard, N.A., Whelan, C. J., Adcock I. (2004).The Journal of Inflammation. *Journal of Inflammation*. 1(1): 1-4.
- Rajagopala, P.L., Sreejitha, K.R., Kironb, S.S., Robin, J., Saritha, M. (2013). Anti-inflammatory (*in vitro*) activity of the Leaves of *Ficus gibbosa* Blume by HRBC Membrane stabilization. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*.7(4): 55-57.
- Rani, A.A., Punitha, S.M.J., Rema, M. (2014). Anti-inflammatory activity of flower extract of cassia auriculata – an in-vitro study. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*. 4(1):57-60.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *free radical biology & medicine*. 26 (9/1): 01231–1237.
- Rousselet, M.C., Vignaud, J.M., Hofman, P., Chatelet, F.P. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire. *AFECAP*. 1-57.
- Rubiolo, P., Casetta, C., Cagliero, C., Brevard, H., Sgorbini, B., Bicchi, C. (2013). *Populus nigra* L. bud absolute: a case study for a strategy of analysis of natural complex substances. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405: 1223–1235.
- Shinde, U.A., Kulkarni, K.R., Phadke, A.S., Nair, A.M., Dikshit Mungantiwar, V.J., Saraf, M.N., (1997). Mast cell stabilizing and lipoxygenase inhibitory activity of Cedrus deodara (Roxb) Loud. *Wood Oil. Indian Journal of Experimental Biology*. 37(3): 258-261.
- Shinde, U.A., Phadke, A.S., Nair, A.M., Mungantiwar, A.A., Dikshit, V.J., Saraf, M.N. (1999). Membrane stabilizing activity a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*.70: 251-257.
- Siler, B., Skoric, M., Misic, D., Kovacevic, B., Jelic, M., Patenkovic, A., Novicic, Z.K. (2014). Variability of European Black Poplar (*Populus nigra* L.) in the Danube Basin. *Novi Sad* . 9-28.
- Stevens, A., Lowe, J., Young, B. (2004). Anatomie pathologique. Edition de boek. p : 2-25.
- Tamil, E.J., Nithya, P.D., lakshmi, N.V., Chand, V.G., Babu, P.S. (2012). *In Vitro* Anti Inflammatory Activity of Tecomaria Capensis (Thunb) Leaves of Different Extracts. *Current Pharma Research*. 2(3): 524-526.
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H., Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*. 43: 632-639.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tramer, F., Da Ros, T., Passamonti, S. (2012). Screening of fullerene toxicity by hemolysis assay. *Methods in Molecular Biology*. 926: 203-217.
- Umopathy, E., Ndebia, E. J., Meeme, A., Adam, B., Menziwa, P., Nkeh-Chungag, B.N., Iputo, J.E. (2010). An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(9): 789-795.
- Umukoro, S., Ashorobi, R.B. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory and membrane stabilizing effect of *Eupatorium odoratum*. *International Journal of Pharmacology*. 2(5): 509-512.
- Van Kessel, K.P., Bestebroer, M., Van Strijp, J.A. (2014). Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Immunology*. 5:1-9.
- Warnant, P., Mertens, P., Marche, C. (2004). Screening of poplar biomass for bio-active compounds: a simple method to assess antioxidant activity. *Bioresource Technology*. 93(1): 43-48.
- Wen, C.C., Chen, H.M., Yang, N.S. (2012). Developing phytochemicals from medicinal plants as immunomodulators. *Advances in Botanical Research*. 62 :198-251.
- Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J., Blake, D.R. (1993). Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*. 49(3): 506-22.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chemistry*. 64: 555-559.

Annexe N°01

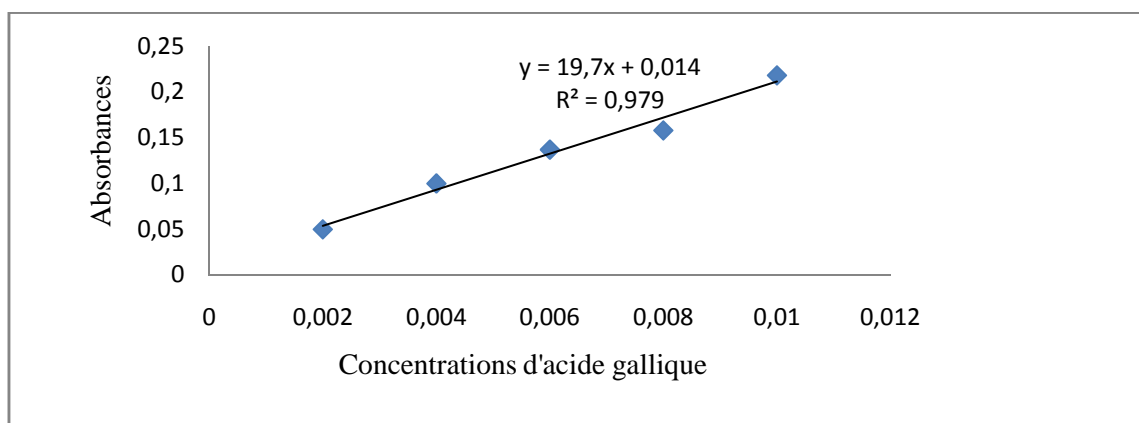


Figure 01 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

Annexe N°02

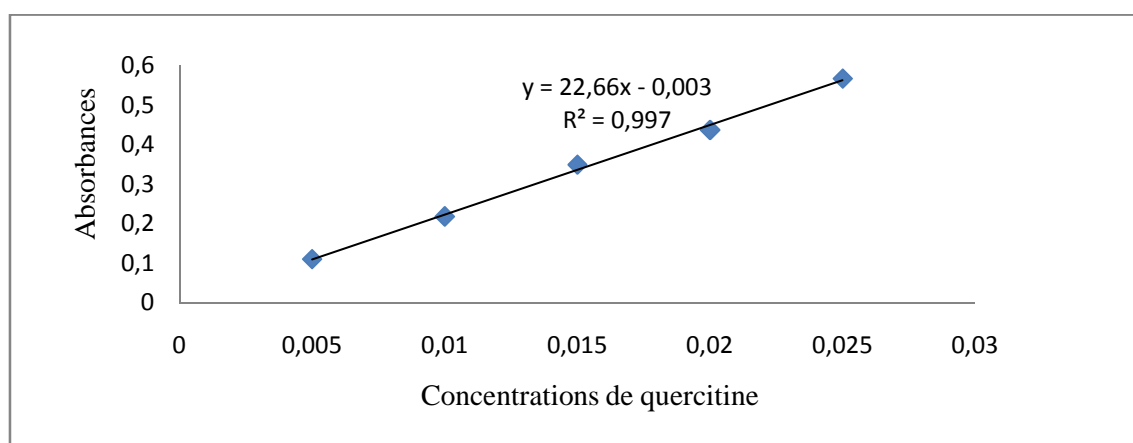


Figure 02 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Annexe N°03

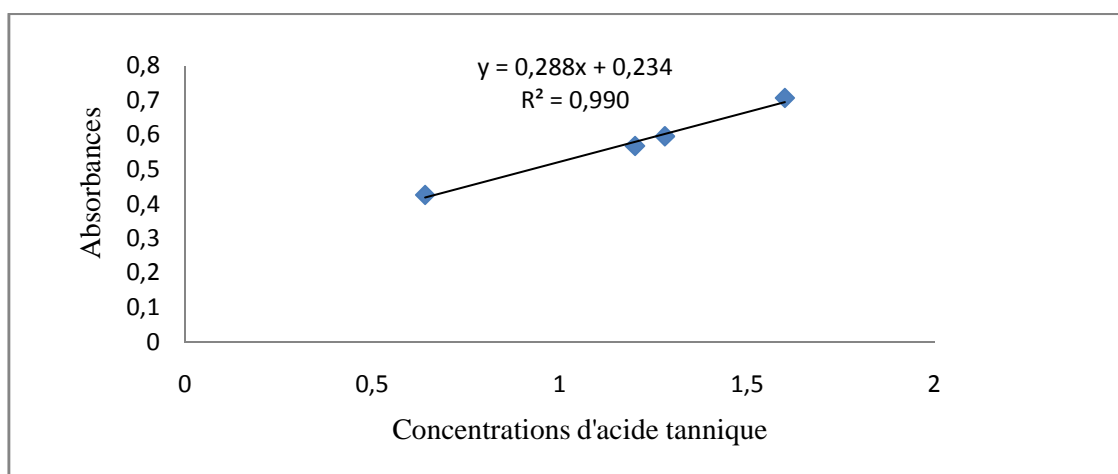


Figure 03 : Courbe d'étalonnage des tannins totaux.

Annexe N°04

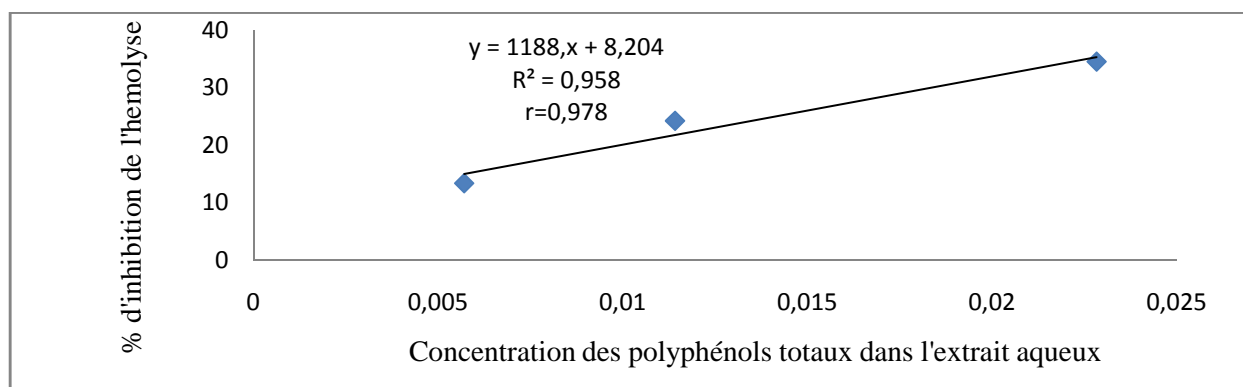


Figure 04: Courbe de corrélation entre les concentrations des polyphénols totaux dans l'extrait aqueux et l'inhibition de l'hémolyse.

Annexe N°05

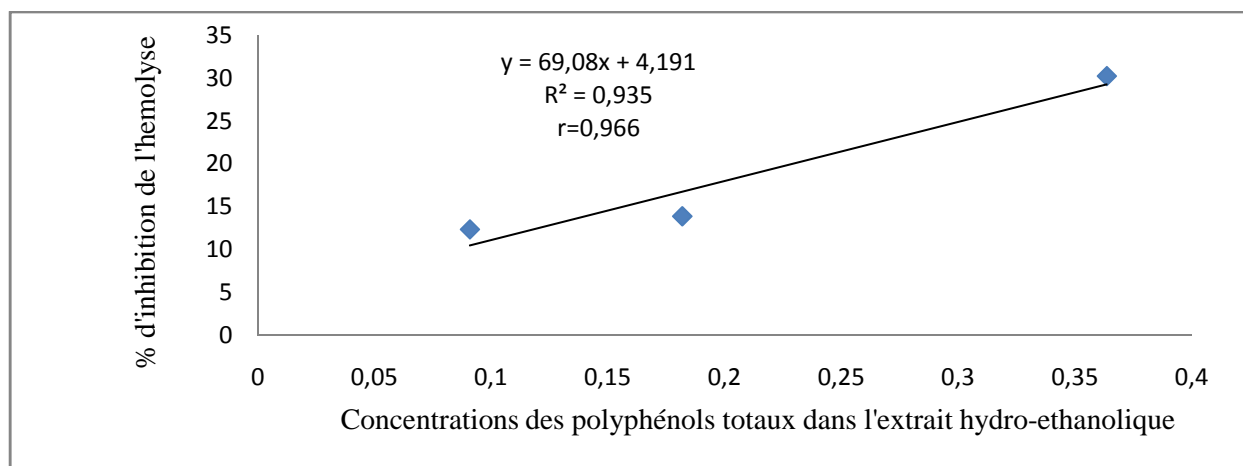


Figure 05 : Courbe de corrélation entre les concentrations des polyphénols totaux dans l'extrait hydro-éthanolique et l'inhibition de l'hémolyse.

Annexe N°06

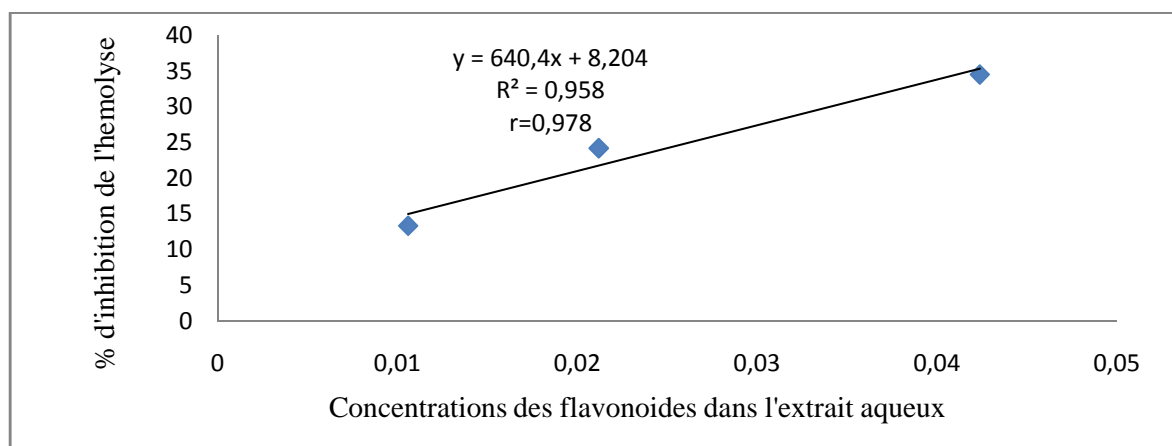


Figure 06: Courbe de corrélation entre les concentrations des flavonoïdes dans l'extrait aqueux et l'inhibition de l'hémolyse.

Annexe N° 07

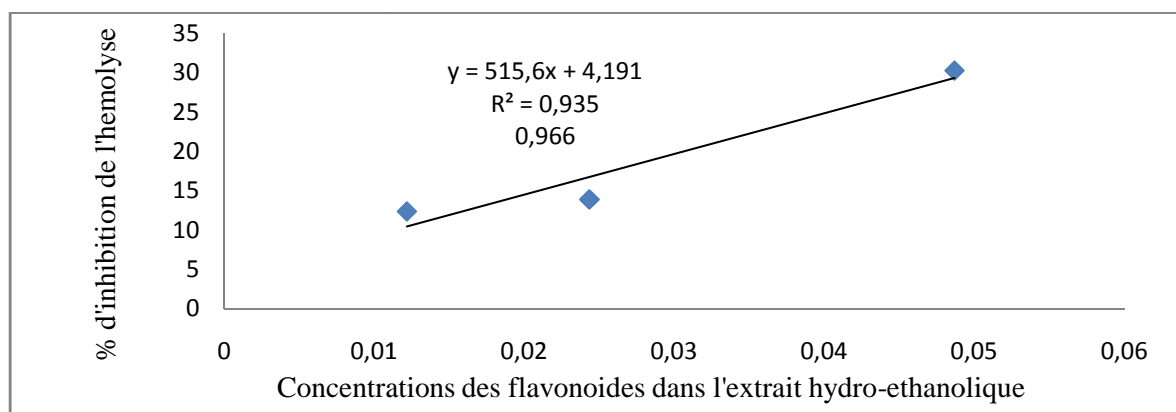


Figure 07 : Courbe de corrélation entre les concentrations des flavonoïdes dans l'extrait hydro-éthanolique et l'inhibition de l'hémolyse.

Annexe N°08

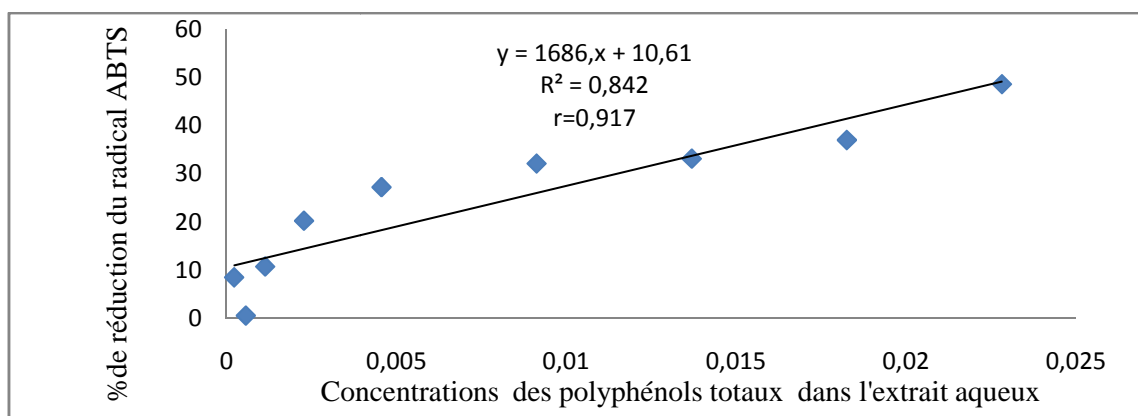


Figure 08: Courbe de corrélation entre les concentrations des polyphénols totaux dans l'extrait aqueux et l'activité anti-radicalaire.

Annexe N°09

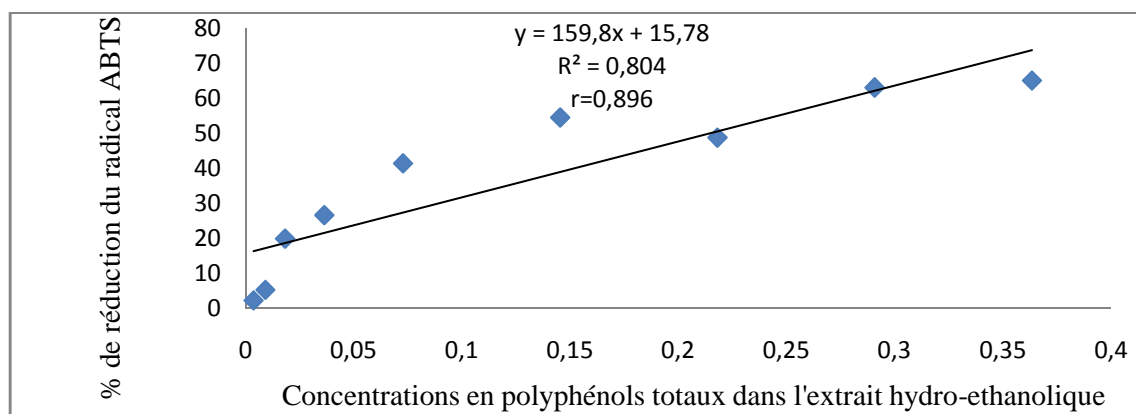


Figure 09 : Courbe de corrélation entre les concentrations de polyphénols totaux dans l'extrait hydro-éthanoliques et l'activité anti-radicalaire.

Annexe N°10

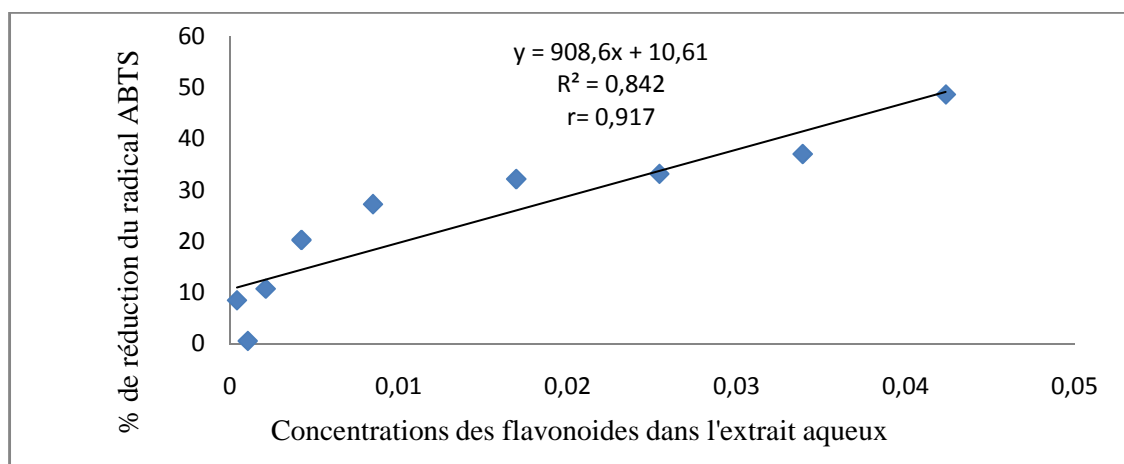


Figure 10 : Courbe de corrélation entre les concentrations des flavonoides dans l'extrait aqueux et l'activité anti-radicalaire.

Annexe N°11

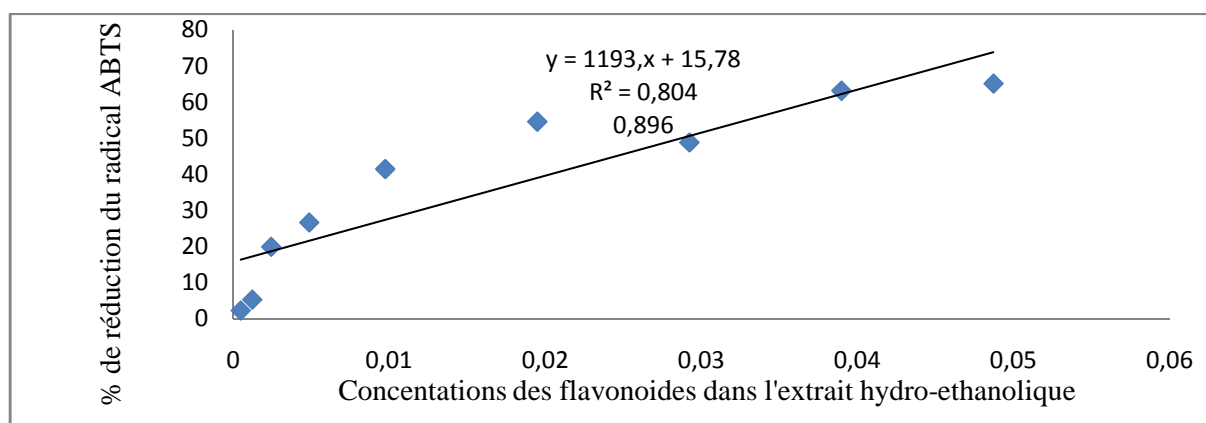


Figure 11 : Courbe de corrélation entre les concentrations des flavonoides dans l'extrait hydro-ethanolique et l'activité anti-radicalaire.

Annexe N° 12

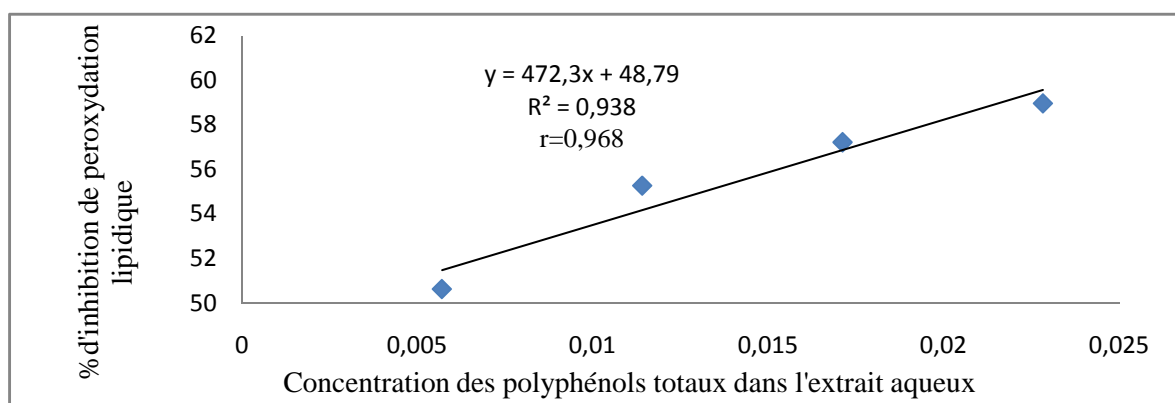


Figure 12 : Courbe de corrélation entre les concentrations des polyphénols totaux dans l'extrait aqueux et l'inhibition de la peroxydation lipidique.

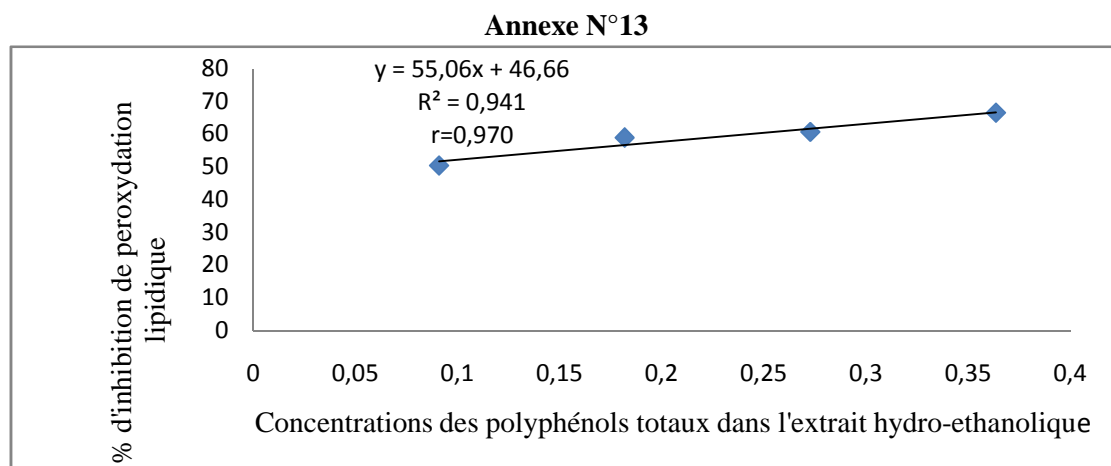


Figure 13 : Courbe de corrélation entre les concentrations des polyphénols totaux dans l'extrait hydro-éthanolique et l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Annexe N°14

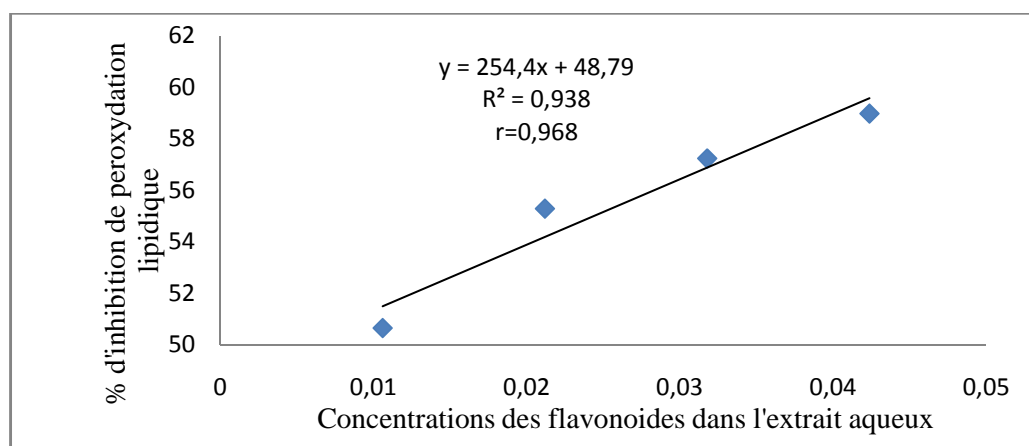


Figure 14 : Courbe de corrélation entre les concentrations des flavonoïdes dans l'extrait aqueux et l'inhibition de la peroxydation lipidique.

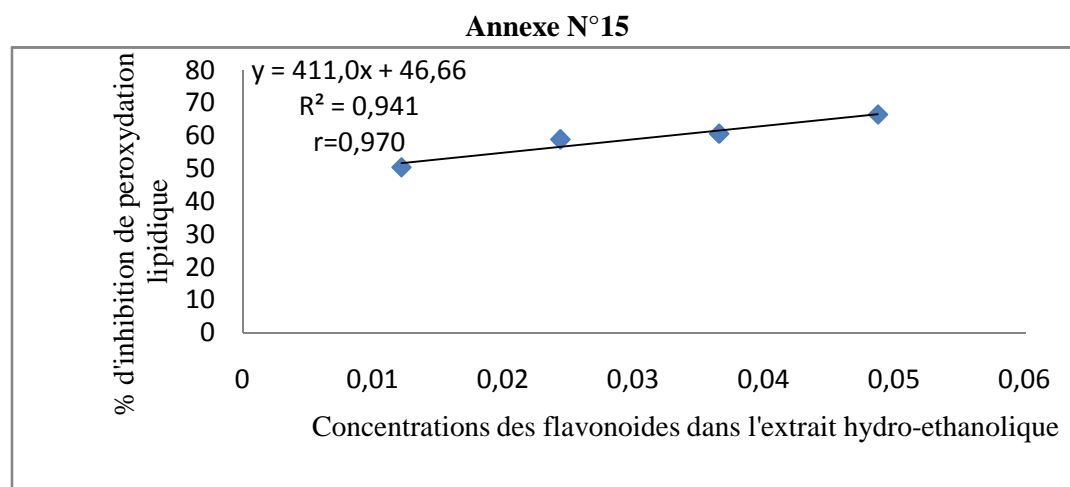


Figure 15 : Courbe de corrélation entre les concentrations des flavonoïdes dans l'extrait hydro-éthanolique et l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Résumé

L'utilisation des bourgeons du *Populus nigra* (peuplier noir) remonte à l'antiquité vue ses nombreuses propriétés thérapeutiques telles que diurétique, antipyrétique et anti-inflammatoire. Dans ce travail, l'activité anti inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux (AQ) et hydro-ethanolique (HE) de bourgeons du peuplier a été testée et mise en évidence. Le rendement de l'extraction aqueuse (25,62 %), est supérieur à celui de l'hydro-éthanolique (11,47 %). L'extrait HE est plus riche que l'AQ en métabolites secondaires avec des teneurs respectives en polyphénols totaux et en flavonoïdes de $363,45 \pm 0,001$ mg EAG/g d'extrait et $48,69 \pm 0,0005$ mg EQ/g pour l'HE contre $228,25 \pm 0,002$ mg EAG/g et $42,36 \pm 0,004$ mg EQ/g pour l'AQ.

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des deux extraits a été évaluée par les tests de stabilisation de la membrane érythrocytaire et les tests antioxydants. L'extrait AQ s'est révélé plus actif pour stabiliser la membrane que l'extrait HE à la concentration de 1 mg/ml avec des pourcentages respectifs de $50,47 \pm 4,57$ % et de $42,41 \pm 11,09$ %. L'activité anti-radical ABTS à 1mg/ml de l'extrait HE et AQ donne des pourcentages de réduction maximaux respectifs de $65,13 \pm 11,95$ %, $IC_{50} = 0,130$ mg/ml et de $48,58 \pm 3,17$ %, $IC_{50} = 0,240$ mg/ml. Encore une fois l'extrait HE a présenté un potentiel chélateur du fer avec un pourcentage maximal de chélation de $79,63 \pm 3,04$ % à 0,1 mg/ml ($IC_{50} = 0,024$) contre de $40,72 \pm 0,62$ % à 0,05 mg/ml ($IC_{50} = 0,022$) pour l'AQ. Il a été enregistré une activité antiperoxydation lipidique pour l'extrait HE $66,55 \pm 1,49$ % statistiquement plus élevée que exhibé par l'extrait AQ avec les pourcentages d'inhibition respectifs de $66,55 \pm 1,49$ % et $58,97 \pm 2,91$ %.

Mots clés : *Populus nigra*, anti-inflammatoire, antioxydant, stabilisation membranaire, lysosome.

Abstract

The use of *Populus nigra* (black poplar) buds dates back to antiquity because of its many therapeutic properties such as diuretic, antipyretic and anti-inflammatory. In this work, the anti-inflammatory activity *in vitro* of the aqueous (AQ) and hydro-ethanolic (HE) extracts of *Populus nigra* was tested and demonstrated. The yield of aqueous extraction (25.62%) is higher than that of hydro-ethanolic one (11.47%). The HE extract is richer than AQ in secondary metabolites with respective levels of polyphenols and flavonoids of 363.45 ± 0.001 mg EAG/g and 48.69 ± 0.0005 mg EQ/g for the HE versus 228.25 ± 0.002 mg EAG/g and 42.36 ± 0.004 mg EQ/g for the AQ.

Extracts' *in vitro* anti-inflammatory activity was tested by the erythrocyte membrane stabilization and antioxidant tests. The AQ extract and with one degree minus the HE showed an ability to stabilize the erythrocyte membrane at the concentration of 1 mg / ml with respective percentages of 50.47 ± 4.57 % and 42.41 ± 11.09 %. The ABTS anti-radical activity at 1 mg / ml of the HE and AQ extracts gives respective maximum reduction percentages of 65.13 ± 11.95 %, $IC_{50} = 0.130$ mg / ml and 48.58 ± 3.17 %, $IC_{50} = 0.240$ mg / ml. The HE is also the best in iron chelating with a maximum percentage of chelation of 79.63 ± 3.04 % at 0.1 mg / ml ($IC_{50} = 0.024$) versus 40.72 ± 0.62 % at 0.05 mg / ml ($IC_{50} = 0.022$) for the AQ. The HE extract also recorded a higher anti-lipid peroxidation activity than the AQ with the respective inhibition percentages of 66.55 ± 1.49 % and 58.97 ± 2.91 %.

Key words: *Populus nigra*, anti-inflammatory, antioxidant, membrane stabilization, lysosome.

المخلص

استخدمت براعم الصفصاف *Populus nigra* منذ العصور القديمة نظراً لخصائصها العلاجية كمدر للبول، خافض للحرارة ومضاد للالتهابات. في هذه الدراسة، تم اختبار وكشف النشاط المضاد للالتهاب مخبرياً (*in vitro*) لكل من المستخلص المائي (AQ) و المائي الإيثانولي (HE). مردود المستخلص AQ (25.62%) أعلى منه في HE (11.47%) بينما HE هو الأعلى من حيث المركبات الفينولية والفلافونيدات والكميات هي على الترتيب 363.45 ± 0.001 مغ مكافئ حمض الغاليك/غ و 48.69 ± 0.0005 مغ مكافئ كيرستين للمستخلص HE مقابل 228.25 ± 0.002 مغ مكافئ حمض الغاليك و 42.36 ± 0.004 مغ مكافئ كيرستين للمستخلص AQ.

الكشف عن النشاط المضاد للالتهاب تم بواسطة اختبار القدرة على تثبيث غشاء الكريات الحمراء واختبارات الأنشطة المضادة للأكسدة. بتركيز 1مغ/مل أظهر المستخلص AQ و بدرجة أقل HE القدرة على تثبيث هذا الغشاء و النسب المئوية هي على الترتيب 50.47 ± 4.57 % و 42.41 ± 11.09%. بتركيز 1مغ/مل أظهر المستخلصان HE و AQ القدرة على إزاحة الجذر الحر ABTS و النسب المئوية القصوى هي على الترتيب 65.13 ± 11.95 %، $IC_{50} = 0.130$ مغ / مل و 48.58 ± 3.17 %، $IC_{50} = 0.240$ مغ / مل. HE هو أيضاً أفضل من حيث خلب الحديد بنسبة أقصاها 79.63 ± 3.04 % عند 0.1 مغ / مل ($IC_{50} = 0.024$) مقابل 40.72 ± 0.62 % عند 0.05 مغ / مل ($IC_{50} = 0.022$) للمائي AQ. كما يسجل القدرة الأعلى من حيث منع أكسدة الدهون بنسبة 66.55 ± 1.49 % مقابل 58.97 ± 2.91 % للمائي AQ.

الكلمات المفتاح: *Populus nigra*, مضاد للالتهاب, مضاد للأكسدة, تثبيث الغشاء, ليزوزوم.