

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Laboratoire de biotechnologie végétale et ethnobotanique

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

Evaluation des activités anti-hémolytique et anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de feuilles de Citrus par test *in vitro*

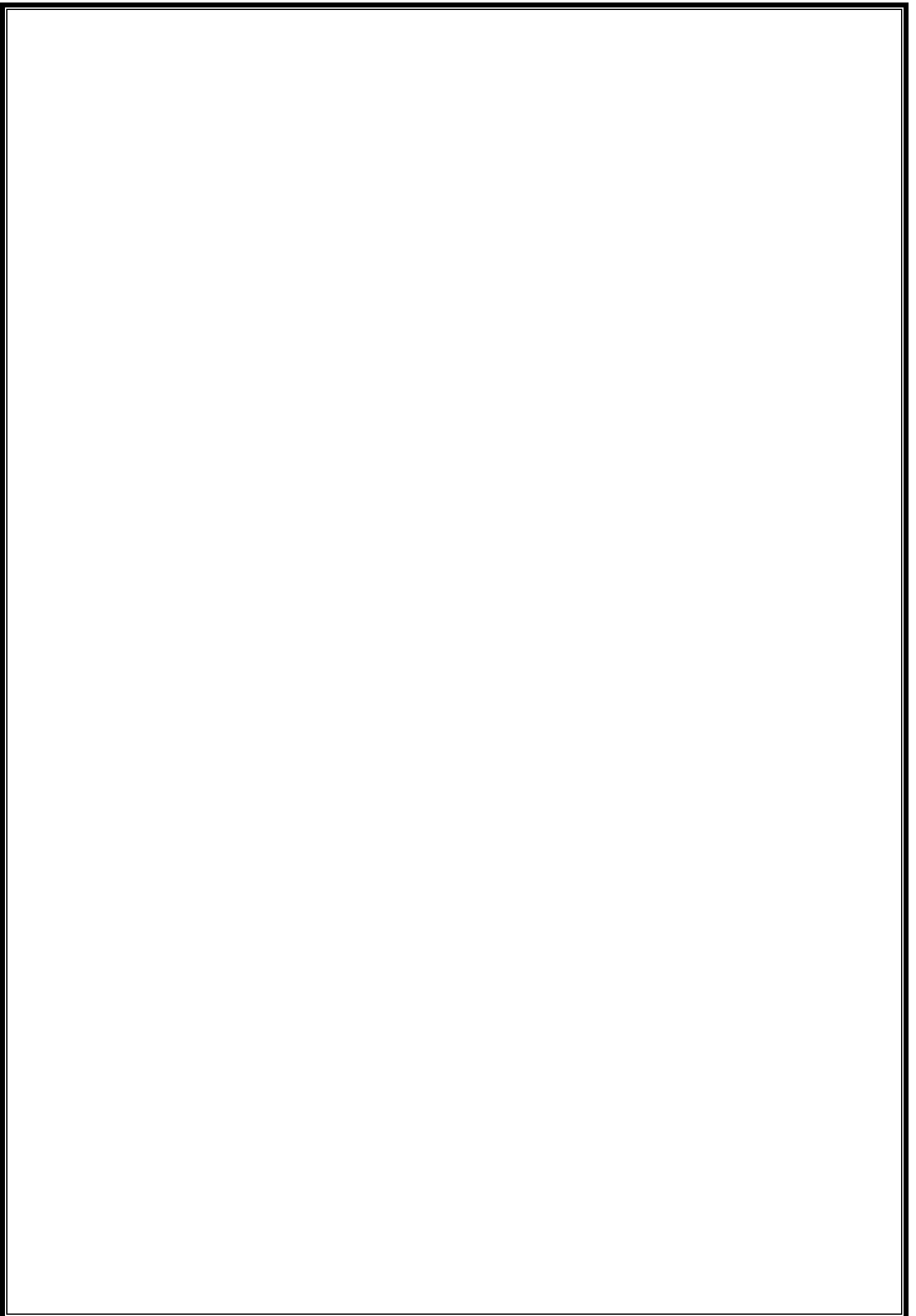
Présenté par

M^{elle} ARIB Sihem & M^{elle} FENNOUCH Sabiha

Composition du jury :

M ^{me} KHETTAL B.	MCA	Encadreur
M ^f BASLI A.	MCB	President
M ^f BRIBI N.	MAA	Examinateur

Année universitaire : **2015/2016**



REMERCIEMENTS

Le thème de ce mémoire a été proposé et réalisé sous la direction du D^r Kfettal Bachra du laboratoire de biotechnologie végétale et ethnobotanique. Faculté des sciences de la nature et de la vie, université A.MIRA -Bejaia.

Avant tout, nous tenons à remercier infiniment et profondément "ALLAH LE TOUT PUISSANT" pour nous avoir donné le courage, la volonté, la santé et surtout la patience pour achever ce travail.

Nos remerciements et notre vive reconnaissance à notre promotrice D^r Kfettal Bachra, pour avoir accepté de nous encadrer et dirigé ce travail par excellence. Aussi bien pour ces conseils judicieux, sa disponibilité, son attention et pour l'ambiance sympathique qu'elle a créée lors de la réalisation de ce travail.

Soyez assuré madame, de notre estime et de nos profonds respects.

Nos remerciements vont aux membres de jury, D^r BASLI A. et D^r BRIBI N. pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de notre mémoire.

Veillez croire messieurs à l'assurance de nos respects et notre considération.

Notre gratitude s'adresse aussi à M^{lle} MAMASSE HABIBA, ingénieur du laboratoire pédagogique d'enzymologie (FSNV Bejaia) pour avoir été à notre écoute et avoir mis à notre disposition le matériel et les moyennes nécessaires à la réalisation de ce travail.

Notre reconnaissance va également aux enseignements du département de biologie physico-chimique qui ont contribué à notre formation.

Nous témoignons enfin notre reconnaissance à tous ceux et celles ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire de fin de cycle.



ARIB Sihem & FENNOUCH Sabiha

Dédicace

A coeur vaillant rien d'impossible. A conscience tranquille tout est accessible. Quand il y a la soif d'apprendre tout vient à point à qui sait attendre. Quand il y a le souci de réaliser un dessein tout devient facile pour arriver à nos fins. Malgré les obstacles qui s'opposent. En dépit des difficultés qui s'interposent.

Les études sont avant tout notre unique et seul atout. Elles représentent la lumière de notre existence.

L'étoile brillante de notre réjouissance.

Nous partons ivres d'un rêve héroïque et brutal. Espérant des lendemains épiques. Un avenir glorieux et magique. Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis Jour et nuit, nous mènerons vers le bonheur fleuri.

Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys, Nous prions dieu que cette soutenance fera signe de persévérance et que nous

Serions enchantés par notre travail honoré.

À ma mère, mon Deuxième Souffle, qui m'a mis au monde, veillé sur moi, et qui a su me transmettre ses valeurs et son chaleureux amour durant toutes ces années qui m'a encouragé et qui a veillé à ce que je réussisse à mes études, qui m'a permis de donner le meilleur de moi-même et me surpasser. Je t'aime aujourd'hui plus qu'hier mais bien moins que demain. Que Dieu te Garde pour nous.

À mon très agréable père, qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est toujours donné du mal pour assurer mon bien-être. J'espère que je suis à la hauteur de ce qu'il attend de moi.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue Vie.

À mes frères et soeurs Mhenni et Walid, Widad et Ibtissem. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie me comble de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser vos vœux les plus chers.

À toute les membres de la famille ARIB et YOUSFI qui ont toujours été derrière moi et qui autour d'eux je n'est j'amaï sentie un jours que je suis malade. Aucun mot ne suffit pour vous exprimer mes sentiments vers vous.

À Mon Ame et mon binôme Sabiha, mes amies Khira, nihade, assia. Et tous les personnels de l'hôpital khelil amerane de bejaia, je dédie ce travail.

je dédie aussi ce travail à tous mes enseignants, pour leurs patience et tous les efforts et leurs conseils pendant nos études, aux étudiants de la promotion de biochimie appliquée 2014/2015, 2015 /2016.



ARIB Sihem

Dédicace

A ceux qui me sont les plus chers

A ceux qui toujours crut en moi

A ceux qui m'ont toujours encouragé



Je dédie ce mémoire à...

Mes Très Chers Parents

Tout d'abord et spécialement à ma chère mère qui aurais été fière de ma réussite. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte maman, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers de vos que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Ge t'aime maman tu va rester toujours dans mon cœur que le Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

Allah yrahmak inchalah

A mon chère père, pour son soutien, son aide et sa compréhension, que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que tu demeures flambeau illuminant le chemin de vos enfants.



Mes frères et sœurs

Fadhila, Noria, Fatah, Ounas, Kamel et Fouad, vous m'avez toujours aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour exprimer mon profond amour et ma reconnaissance pour les honorables services soutenus. Votre joie et gaieté me comblent de bonheur. Puisse à Dieu vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.



Ma grande famille

A mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses, A mes chers cousins et cousines et à tous les membres de la famille FENNOUCH et AMRAN petits et grands puissions nous restons toujours unis.



Mes amis

À ma chère binôme Sihem, à tous mes amis surtout Katia, Karima et Souhila en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Je dédie ce travail aussi, à mes enseignements qui m'ont suivi tout au long de mon cursus universitaire, avec toutes mes considérations pour les efforts fournis de leur part afin que je puisse arriver à ce stade.

À tout la promotion 2015 Biochimie Appliquée Sans exception à ma promotrice D^r KHETTAL B. Merci

Enfin je le dédie à moi-même!

FENNOUCH Sabiha

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I

I.1-Inflammation.....3

I.1.1-Définition et Généralités.....3

I.1.2-Facteurs étiologiques.....4

I.1.2.1-Facteurs exogènes.....4

I.1.2.2-Facteurs endogènes.....4

I.1.3-Physiologie de l'inflammation.....4

I.1.3.1-Les cellules de l'inflammation.....5

I.1.3.2-Médiateurs de l'inflammation.....7

I.1.4-Types d'inflammation.....14

I.1.4.1-Inflammation aiguë.....14

I.1.4.2-Inflammation chronique.....15

I.1.5-Pathologies inflammatoires.....16

I.2- Anti-inflammatoires.....17

I.2.1-Généralités.....17

I.2.2-Mode d'action des anti-inflammatoires.....21

Matériel et méthodes

Chapitre II

II.1-Extraction et quantification des polyphenols dans les extraits éthanoliques des feuilles de citrus.....	23
II.1.1-Préparation du matériel végétal.....	23
II.1.2-Extraction éthanolique.....	23
II.1.3-Analyse quantitative des polyphénols.....	24
II.1.3.1-Dosage des polyphénols totaux.....	24
II.1.3.2-Dosage des flavonoïdes.....	25
II.2-Etude <i>in vitro</i> de l'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques des feuilles de citrus.....	26
II.2.1-Extraction de l'ovalbumine.....	26
II.2.2-Mise au point du protocole d'étude de la dénaturation thermique de l'ovalbumine	26
II.2.3-Evaluation de l'Effet anti-thermo dénaturant des extraits de citrus.....	27
II.3-Evaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits éthanoliques des feuilles de citrus.....	28
II.3.1-Préparation de la suspension érythrocytaire.....	28
II.3.2-Détermination de l'effet anti-hémolyse induite par le triton.....	28
II.3.2.1-Mise au point du test de l'hémolyse induite par le tritonX100.....	28
II.3.2.2-Mesure de l'effet inhibiteur de l'hémolyse des les extraits de citrus.....	29
II.3.3-Détermination de l'effet inhibiteur de l'hémolyse induite par peroxyde d'hydrogène des extraits de citrus.....	29

Résultats

Chapitre III

III.1-Taux d'extraction.....	31
III.2-Taux des polyphenols dans les extraits éthanoliques.....	31
III.3-Activités inhibitrice de la dénaturation de l'ovalbumine des extraits de citrus.....	32
III.3.1-Optimisation des paramètres influençant la dénaturation thermique.....	32
III.3.2-Effets inhibiteurs de la dénaturation thermique de l'ovalbumine.....	34
III.3.3-Efficacité des extraits.....	35
III.3.4-Corrélation entre l'effet anti-dénaturant et les teneurs en polyphénols.....	35
III.4-Effet anti-hémolytique des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus.....	36
III.4.1-Effet des extraits de Citrus sur l'hémolyse induite par tritonX100.....	36
III.4.1.1-Effet de triton X100 et d'éthanol sur l'hémolyse.....	36
III.4.1.2-Inhibition de l'hémolyse induite par le triton X100.....	36
III.4.2-Effet des extraits de Citrus sur l'hémolyse induite par l'H ₂ O ₂	38
III.4.3-Efficacité des extraits.....	38
III.4.4-Corrélation entre l'activité anti-hémolytique et les teneurs en polyphénols.....	39
III.4.5-Corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et l'activité anti-hémolytique.....	40

Discussion générale

Conclusion.....	46
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

AA : Acide arachidonique.

Abs : Absorbance

ACTH : Adrenocorticotropine

AINS : Anti -inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Anti -inflammatoires stéroïdiens

AP : Voie alterne

BCR : Récepteur couplé au lymphocyte B

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COX1-1: Cyclooxygénase-1

COX2: Cyclooxygénase-2

CP : Voie classique

CRF : Facteur de libération de la corticotropine

CWTS : Centre de transfusion sanguine de la wilaya de Bejaia

DO : Densité optique

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

EOR: Espèces réactifs oxygénés

EqAG ; Equation d'acide galique

EqQ : Equation de quercetine

ERN: Espèces réactifs nitrogènes

Fe²⁺ : Ions ferreux

Fe³⁺ : Ions ferriques

FeCl₂ : Chlorure de Fer

FH : facteur de Hageman

GR : Globules rouges

H-1: Histamine-1

H-2: Histamine-2

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

H-3: Histamine-3

HPETE : Hydroperoxy eicosatetraénoïques

HSP : Protéine de choc thermique

IC50: Concentration inhibitrice à 50 %

ICAM : Intra cellular adhésion molécule

IFN- α : Interféron alpha

IFN- β : Interféron beta

IFN- γ : Interféron gamma

IL-10 : Interleukine-10

IL-13 : Interleukine-13

IL-15 : Interleukine-15

IL-1 β : Interleukine-1beta

IL-2 : Interleukine-2

IL-4 : Interleukine-4

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine-8

LB : Lymphocytes B

LDL : Low densité lipoprotéine

LFA-1 : Lymphocytes function associated antigen-1

LP : Voie lectine

LT : Lymphocytes T

LTB₄ : Leucotriène B₄

LTC₄ : Leucotriène C₄

LTD₄ : Leucotriène D₄

LTE₄ : Leucotriène E₄

OH : groupe hydroxyle

PAF : Facteur activateur de plaquettes

PDF : Produits de dégradation de la fibrine

PGD2 : Prostaglandine D2

PGE2 : Prostaglandine E2

PGI2 : Prostaglandine I2

PK : Prékalllicréine

PSGL1 : P-selectinglycoprotein ligand 1

Rpm : Rotation par minute

TCR : Récepteur couple au lymphocyte T

TGF- β : Facteur de croissance tumoral β

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

TXA2 : Thromboxane A2

TXB2 : Thromboxane B2

VCAM : Vascular cell adhesion molecule

Numéro de la figure	Titre	Page
01	Synthèse des leucotriènes, des prostaglandines et des thromboxanes à partir des phospholipides membranaires	9
02	Libération des radicaux libres oxygénée par les macrophages	13
03	Chélation de trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes	25
04	Variation de DO de l'ovalbumine incubé 70°C en fonction du temps pour différentes concentration de la protéine mesurée à $\lambda= 416\text{nm}$ (a) et $\lambda= 660\text{nm}$ (b).	33
05	Taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus	34
06	Courbes de corrélation linéaire entre l'activité anti-dénaturante et les teneurs en polyphénol. a) Corrélation entre l'activité anti-dénaturante et les teneurs en phénols totaux des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus. b) Corrélation entre l'activité anti-dénaturante et les teneurs en flavonoïdes.	36
07	Courbes représentant l'effet de TritonX100 et de l'éthanol sur l'hémolyse des globules rouges	37
08	Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par l' H_2O_2 à différentes concentrations des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus	38
09	Courbes de corrélation entre l'activité anti hémolytique et les teneurs en phénols totaux a) corrélation entre l'activité anti hémolytique et les teneurs en phénols totaux des extraits éthanoliques de Citrus. b) corrélation entre l'activité anti-hémolytique et les teneurs en flavonoïdes.	39
10	Courbes de corrélation linéaire entre l'activité anti-inflammatoire et l'activité anti-hémolytique des extraits des feuilles de Citrus.	40

Numéro de tableaux	Titre	Page
I	Sources et rôles de quelques cytokines intervenant dans la réponse inflammatoire.	12
II	Exemples de maladies liées à l'inflammation.	16
III	Tableau recapitulatif de quelques exemples d'anti-inflammatoires	18
IV	Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-inflammatoire	19-20
V	Taux d'extraction par macération dans l'éthanol des feuilles des différentes espèces et variétés de Citrus.	31
VI	Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des feuilles de différentes espèces de Citrus.	32
VII	Effet de la concentration d'éthanol sur la dénaturation thermique d'ovalbumine.	33
VIII	Efficacité de l'activité anti-dénaturante de la protéine d'ovalbumine des extraits éthanoliques des feuilles de différents espèces et variétés de Citrus représentée et du diclofenac.	35
IX	Effet des extraits des feuilles de citrus sur l'hémolyse induite par le tritonX100.	37
X	Efficacité anti-hémolytiques des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus exprimées en IC50.	39

Introduction

L'inflammation est un phénomène réactionnel généré par l'organisme à chaque fois que l'intégrité de ses constantes morphologiques et biologiques est menacée (**Gbenou et al., 2011**). C'est un processus habituellement bénéfique dont le but est d'éliminer l'agent pathogène et les lésions tissulaires consécutives à l'agression. La réaction inflammatoire passe par la mise en jeu successive de moyens de défense non spécifiques et spécifiques. Elle résulte de l'intervention coordonnée d'une série de cellules effectrices, de médiateurs plasmatiques et cellulaires secrètes par le système immunitaire chargées de diriger les cellules vers le foyer inflammatoire (**Muster, 2005**), d'augmenter la perméabilité membranaire et d'induire la réponses immunitaires adaptative. Parfois la réaction inflammatoire est néfaste du fait de la brutalité et l'agressivité de l'agent pathogène et sa résistance à la mise en jeu des moyens de défense de l'organisme, de l'exagération des phénomènes normaux et des déficits fonctionnels (**Kumar et al., 2011**). L'inflammation est considéré alors comme pathologique, elle est associée ou conduit à l'apparition de plusieurs maladies allant de l'arthrose au rhumatisme articulaire, l'obésité et divers autres pathologies (**Leelaprakash, 2010**).

De nombreux médicaments anti-inflammatoires de synthèse sont disponibles pour traiter l'inflammation. Cependant, l'utilisation de ces substances de synthèse est accompagnée généralement d'effets secondaires indésirables. Pour pallier à ces effets, l'industrie pharmaceutique développe des recherches pour identifier de nouvelles molécules à activités anti-inflammatoires plus efficaces et à moindre effets secondaires. Dans cette optique, un des axes de recherche développé est orienté vers la découverte de molécules bioactives d'origine végétale, à partir de plantes médicinales principalement. En effet, en médecine traditionnelle, les plantes sont utilisées depuis longtemps en raison de leurs effets thérapeutiques potentiels divers anti-radicalaires, antimicrobiens et anti-inflammatoires qui sont généralement liées au plusieurs métabolites bioactifs tel que les polyphénols (**Karthik et al, 2013**).

Dans cet optique s'inscrit notre travail qui a pour objectif d'évaluer si les plantes du genre de Citrus, riche en antioxydants comme les polyphénols, flavonoïdes l'acide ascorbique, (**Guasmi et al., 2009**), contiennent des métabolites à potentiels anti-inflammatoires. Pour cela, nous avons choisi comme sources végétales, les feuilles de différentes variétés d'agrumes des espèces *Citrus sinensis*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* cultivées dans les vergers d'agrumes de la commune de Sidi Aich (Bejaia) et comme

méthodes d'étude du potentiel anti-inflammatoire, des tests de mesure, *in vitro*, basés sur la capacité des anti-inflammatoires à stabiliser les protéines et les membranes cellulaires.

Le présent manuscrit comportant l'étude théorique et l'étude pratique réalisée est structuré comme suit :

- ✓ Une introduction décrivant la problématique, l'objectif du thème ainsi que la démarche globale choisie pour réaliser ce mémoire.
- ✓ Un chapitre (chapitre I) comportant une synthèse bibliographique sur la physiologie de l'inflammatoire et les modes d'actions des anti-inflammatoires.
- ✓ Un chapitre (chapitre II) décrivant la méthodologie suivie en l'occurrence la démarche menée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique des extraits de feuilles de citrus :
 - Extraction et quantification des composés phénoliques.
 - Évaluation du pouvoir des extraits éthanoliques à inhiber la dénaturation thermique de l'ovalbumine
 - Evaluation du pouvoir des extraits éthanoliques de Citrus à inhiber l'hémolyse induite par le tritonX100 ou le peroxyde d'hydrogène des érythrocytes.
- ✓ Deux chapitres (chapitres III et IV) sont consacrés à la description des principaux résultats obtenus et leurs discussions.
- ✓ Une conclusion à la fin du manuscrit récapitulant les principaux résultats obtenus, leurs limites et impacts et les perspectives qui en découlent.

Synthèse bibliographique

I.1-INFLAMMATION

I.1.1-Définition et Généralités

L'hémostase est une propriété fondamentale des systèmes biologiques qui préserve leurs stabilités en maintenant les variables clés de leurs régulations. Elle est entretenue au niveau de l'organisme entier dans différents tissus et plus spécifiquement à l'intérieur des cellules (**Buchman, 2002**). Parmi les processus conduisant à un retour à l'homéostasie, citant la cicatrisation du tissu lésé est l'inflammation (**Barton, 2008**).

L'inflammation peut se définir comme un processus biologique complexe vasculaire et tissulaire induit par des agents agressifs tels que les agents pathogènes, les irritants ou les cellules endommagées (**Sarkhel, 2015**). L'inflammation se manifeste par des symptômes plus ou moins pénibles comme la rougeur, la douleur, la chaleur et la tuméfaction. La fonction principale de la réponse inflammatoire vise à réparer les lésions tissulaires consécutives à l'agression ainsi que le retour à l'homéostasie du tissu lésé (**Barton, 2008**). Sa mise en œuvre est le fruit d'une intervention coordonnée d'une série de médiateurs chimiques; et de plusieurs cellules effectrices selon différentes voies de signalisation (**Kvietys et Granger, 2012**).

Dans le cas par exemple d'une agression par un microorganisme, une réaction inflammatoire de défense est mise en place. En effet, les microorganismes rencontrés chaque jours par un individu sont détectés et détruits par les mécanismes de défense innés qui agissent immédiatement après l'invasion par le pathogène induisant une réponse rapide contre ce dernier. Si le microorganisme dépasse la première ligne de défense, une réponse immunitaire adaptative se développe conduisant à la génération de cellules effectrices spécifiques du pathogènes et de cellules mémoires capables de prévenir une infection ultérieurs par le même microorganisme (**Weill et Batteux, 2003**).

La réponse inflammatoire se déroule en quatre phases distinctes: la reconnaissance de l'agent pathogène, le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'infection, l'élimination du microorganisme et la résolution de l'inflammation. Dans les processus de défense de l'organisme, la réaction inflammatoire est bénéfique bien que souvent le débordement de certains médiateurs entraîne un grand nombre de conséquences délétères voire néfastes pour l'organisme (**Barton, 2008**).

I.1.2-Facteurs étiologique

Plusieurs facteurs sont capables d'induire une réponse inflammatoire contre les lésions tissulaires et les infections par les pathogène. Chacun de ces déclencheurs représentent une contrainte qualitativement distincte au système immunitaire (**Barton, 2008**). Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et peuvent être d'origine exogène ou endogène. Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation.

I.1.2.1-Facteurs exogènes

Les indicateurs exogènes de l'inflammation sont traditionnellement repartis aux :

- ✓ Agents biologiques : les bactéries, les virus, les parasites et les champignons.
- ✓ Agents physiques comme les brûlures, les radiations, le froid, la chaleur, les piqûres, coupures, le frottement, le courant électrique et les rayonnements dont l'action mécanique provoque des lésions tissulaires.
- ✓ Agents chimiques et toxiques tels que les caustiques (bases et acides), les toxines et venins (**Silbernagelet et Lang., 2000; Barton, 2008**).

I.1.2.2-Facteurs endogènes

Les cellules tumorales mortes, les anomalies de la réponse immunitaire, les allergènes, les réactions auto-immunes, les cristaux formés dans l'organisme (urée, oxalate, phosphate de calcium, cholestérol...etc) ainsi que les défauts de vascularisations provoquées par l'ischémie peuvent également déclencher la réaction inflammatoire (**Silbernagelet et Lang., 2000; Barton, 2008**).

I.1.3-Physiologie de l'inflammation

L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, des modifications de la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire. Quelque soit le siège, et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, à l'organe où se déroule la réaction inflammatoire, au terrain

physiologique de l'hôte. Tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel (Charles et al., 2010).

I.1.3.1-Les cellules de l'inflammation

Les cellules de tout tissu sont comprises dans un ensemble de fibre, de collagène et de fibres élastiques englobées dans un gel de proteoglycanes dans lequel se trouvent des polynucléaires phagocytaires mononuclées (les polynucléaires neutrophiles et les phagocytes mononucléaires), les lymphocytes, les polynucléaires basophiles, les mastocytes, les polynucléaires éosinophiles, les plaquettes et les fibroblastes (Charles et al., 2010).

a) Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires regroupent les polynucléaires neutrophiles qui constituent la première ligne de défense contre les pathogènes. Ce sont les premières cellules à migrer vers le foyer lésé, elles possèdent un noyau à plusieurs lobes et un cytoplasme très granuleux (Lawrence et al., 2010). Les macrophages et les monocytes sont d'autres cellules effectrices de l'immunité innée capables d'éliminer les agressions par phagocytose. Ces cellules participent à la réponse immunitaire spécifique en jouant un rôle dans le déclenchement et l'expression des réponses immunitaires en présentant l'antigène associé au CMH II aux lymphocytes T, en libérant des espèces réactives de l'oxygène, des enzymes hydrolytiques qui contribuent à la destruction d'éléments étrangers et en sécrétant de nombreux médiateurs inflammatoires dont les plus importants sont le facteur de nécrose de tumeur- α (TNF- α), l'interleukine 1β (IL 1β), l'IL-6 et des chimiokines comme l'IL-8. En plus des cytokines, les macrophages activés produisent des protéines du complément qui favorisent l'inflammation (Kindt et al, 2008).

b) Les lymphocytes

Les cellules B et les cellules T sont deux populations différentes de lymphocytes, localisées au niveau du sang et des tissus lymphoïdes. Elles sont capables de reconnaître les antigènes grâce à des récepteurs membranaires spécifiques situés sur leurs surfaces les TCR pour les LT et BCR pour LB (Lee et Lee, 2014). Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes responsables de l'immunité adaptative humorale et les lymphocytes T favorisent la réponse immunitaire cellulaire spécifique qui vise à détruire les agents pathogènes. Il existe deux types de lymphocytes T : les LT cytotoxiques qui détruisent les cellules hôtes hébergeant l'antigène étranger (les allogreffes et les tumeurs) et les cellules T helper qui

activent d'autres lymphocytes et macrophages par la libération des médiateurs de l'inflammation. Les cellules nature tueuses constituent un autre type de lymphocytes qui négocie l'immunité innée contre les cellules cancéreuses ou encore contre les cellules infectées par les virus par l'intermédiaire de leur capacité à sécréter des cytokines comme l'IL 18 (O'Connor *et* Nichol., 2015).

c) Les polynucléaires basophiles

Les polynucléaires basophiles comportent des granulations qui contiennent des médiateurs chimiques de l'inflammation, en particulier l'histamine. Elles constituent également une source de cytokines régulatrices comme IL-4 et IL-13. Ce sont des cellules impliquées dans l'initiation du phénomène inflammatoire et le recrutement des cellules immunitaire (Letonturier, 2007).

d) Les Polynucléaires éosinophiles

Les éosinophiles sont importants pour l'immunité innée, particulièrement dans la défense contre des infections parasitaires. Elles jouent également un rôle central dans le développement des réponses contre l'allergie. Ces cellules interviennent dans la modulation et la propagation de la réponse immunitaire adaptative en activant directement les lymphocytes T (Lee *et* Lee, 2014).

e) Les mastocytes

Les mastocytes sont parmi les premiers acteurs du système immunitaire inné à rencontrer et à éliminer les infections par les parasites et les bactéries (Espinosa *et* Chillet, 2010). Elles sont distribuées dans tout l'organisme à proximité des vaisseaux sanguins. Leurs cytoplasmes renferment de nombreuses granulations ou sont stockés différents médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, les prostaglandines, les leukotriènes et les cytokines pro-inflammatoires comme IL-1- β , IL-6, IFN- γ et TNF- α (Barton, 2008).

f) Les plaquettes

Les plaquettes sont des cellules anucléées provenant de la fragmentation des mégacaryocytes et jouant un rôle essentiel dans l'hémostase primaire en permettant l'arrêt du saignement au niveau du tissu lésionnel. Au cours d'une inflammation tissulaire, ces cellules vont être activées par des médiateurs inflammatoires comme les chimiokines permettant ainsi

leur adhésion sur l'endothélium orchestrant ainsi la réponse inflammatoire (**Dunois-Lardé et Baruch, 2011**)

g) Les fibroblastes

Ce sont les cellules que l'on retrouve dans la matrice extracellulaire du tissu conjonctif et dont le rôle est la production de collagène. Les fibroblastes peuvent être activés et participer à la réponse immunitaire via la synthèse des cytokines comme INF- α , TNF- α , IL-8 et IL-1 et des prostanoïdes, Au cours de la réaction inflammatoire, ils produisent des enzymes de destruction de la matrice extracellulaire: collagénases, stromélysine, cathepsines, sérine protéase. Ils participent aussi aux phénomènes de cicatrisation par la production de différents constituants de la matrice comme les collagènes, protéoglycanes, laminine, élastine (**Buckley et al., 2001**).

I.1.3.2-Médiateurs de l'inflammation

La réaction inflammatoire est sous la dépendance de plusieurs médiateurs plasmatiques ou cellulaires qui agissent en synergie pour induire une réponse inflammatoire.

a-Systèmes d'activation plasmatique

Il s'agit de systèmes multi protéiques dont les composants sont produits à distance du foyer inflammatoire. Les différents composants de ces systèmes sont présents dans le sang circulant où ils demeurent à l'état de précurseurs inactifs, jusqu'à ce qu'ils soient mis en présence d'un activateur spécifique. Ces systèmes présentent des relations fonctionnelles étroites.

- **Système de complément**

Le complément est un système complexe de surveillance immunitaire représentant la première ligne de défense contre les cellules étrangères. C'est un système multienzymatique composé d'une vingtaine de protéines solubles à synthèse hépatique sous forme circulant dans le plasma et sous forme de récepteurs membranaires à la surface de nombreux types cellulaires (**Merle et al., 2015**). Les constituant protéiques du système complément sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs dont l'activation se fait à partir de trois voies principales : la voie classique (CP) par des complexes antigènes-anticorps, la voie alterne(AP) grâce à différents activateurs comme les polysaccharides, les lipopolysaccharides bactériens, des cellules infectées par des virus, des levures et des

parasites et la voie des lectines (LP) activé par la lectine liant le mannose, qui coopère avec les glycoprotéines et les glycolipides microbiens. Ces trois voies aboutissent à la formation des C3 et C5 convertase induisant la libération des anaphylatoxines C3a et C5a qui possèdent d'importantes capacités chimiotactiques sur les cellules inflammatoires dont les polynucléaires neutrophiles et les macrophages. Le système du complément intervient dans la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'extravasation des leucocytes, stimule la dégranulation des mastocytes et favorise l'opsonisation grâce à la fraction C3 (Markiewski et Lambris, 2007).

- **Protéines du système contact**

Le système contact est constitué des Kininogènes, protéines à poids moléculaire élevé et précurseurs inactifs des kinines, du facteur de Hageman (FH) ou facteur XIIa, de la prékallicroïne (PK) et du facteur XI. Outre son rôle de stimulateur de l'agrégation et la dégranulation des polynucléaires neutrophiles, le facteur FXIIa (facteur de Hengmen) activé provoque l'activation de la prekaléikreine pour former la kallicroïne (Schmaier, 2015). Cette dernière intervient dans le clivage des kininogènes pour former la bradykinine et le kallidin qui sera transformé en bradykinine par l'élimination de la lysine N-terminale sous l'effet d'une aminopeptidase plasmatique (Medjadba *et al.*, 2015). La bradykinine déclenche la production par les cellules endothéliales du PGI₂, de la thromboxane A₂, d'activateur tissulaire du plasminogène. Elle favorise la formation d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par stimulation de phospholipase A₂. C'est ainsi un puissant médiateur de l'inflammation à l'origine de la sensation de la douleur, de la vasodilatation, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, de la margination des leucocytes. Elle agit via des récepteurs membranaires spécifiques couplés à la protéine G : les récepteurs B₁ et les récepteurs B₂. Ils interviennent dans la régulation de plusieurs fonctions vasculaires et rénales ; agissent avec la plasmine en activant la voie alterne de complément. (Golias *et al.*, 2007).

- **Systèmes de coagulation-fibrinof formation et fibrinolyse**

L'inflammation et la coagulation sont deux principaux systèmes de défense de l'hôte qui interagissent l'un avec l'autres, l'inflammation active la coagulation et cette dernière module l'activité inflammatoire par plusieurs facteurs tel que la thrombine (Petaga *et al.*, 2011). La cascade de coagulation est divisée en deux voies, La voie intrinsèque est une série de protéines de plasma qui sont activées par le facteur de Hageman, une protéine synthétisée

dans le foie qui est activé en se liant au collagène induisant ainsi la formation de la thrombine. En revanche, la voie extrinsèque est lancée par la production de plusieurs facteurs tissulaires qui existent sur les cellules endothéliales et les monocytes. Les deux voies de coagulation aboutissent à l'activation d'une protéase multifactorielle de nature serine qui active la thrombine responsable d'une transformation accrue de fibrinogène en fibrine causant finalement un dépôt de la fibrine dans le site inflammatoire en exerçant un effet chimiotactique pour les monocytes. L'activation du système de la fibrinolyse conduit à la formation de plasmine (à partir de son précurseur plasmatique : le plasminogène) qui joue le rôle d'une protéase de clivage la fibrine en produits de dégradation de la fibrine (PDF) ce qui augmente la perméabilité vasculaire (Danckwardt et al., 2013).

b-Médiateurs cellulaires

- Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes représentent une famille de médiateurs lipidiques qui dérivent de l'acide arachidonique (AA) libéré à partir des phospholipides membranaires des cellules inflammatoires sous l'action des phospholipases A2. Ces médiateurs regroupent les prostaglandines (PGE2, PGD2), la prostacycline (PGI2), les thromboxanes (TXA2 et TXB2), les leucotriènes (LTB4, LTC4, LTD4 et LTE4), et le facteur activant les plaquettes (PAF acether) (Larsen et al., 2015). Deux grandes voies enzymatiques ; voie lipooxygénase et voie cyclooxygénase (COX), interviennent dans le métabolisme de l'acide arachidoniques (Figure 1).

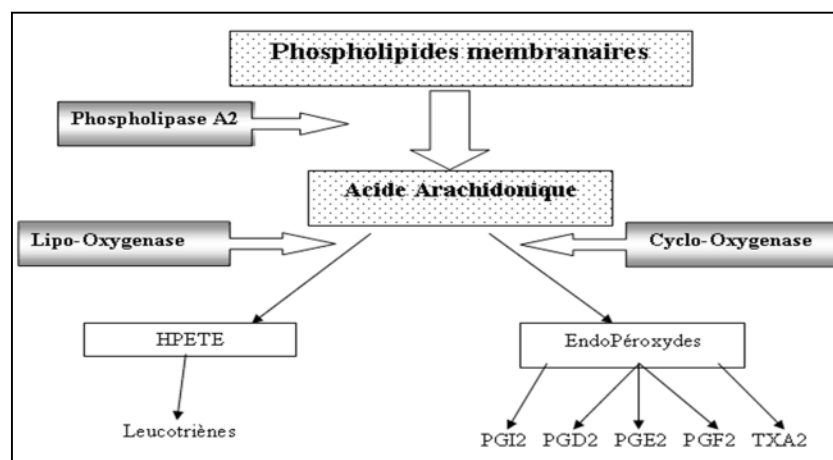


Figure 1 : Synthèse des leucotriènes, des prostaglandines et des thromboxanes à partir des phospholipides membranaires (Weill et Batteux, 2003).

La voie cyclooxygénase, via la COX-1 constitutive, conduit à la synthèse des médiateurs impliqués dans le processus d'agrégation plaquettaire et dans l'hémostase de plusieurs organes dont le tractus gastro-intestinal et le rein. Par l'action de la COX-2 inductible, la voie cyclooxygénase mènent à la synthèse des prostaglandines médiateurs de l'inflammation. La voie des lipooxygénases quant à elle permet la synthèse des leucotriènes via la formation des hydroperoxy eicosatétraénoïques (HPETE) (**Shaikh et al., 2015**).

Les prostaglandines libérées essentiellement par les neutrophiles pendant la phagocytose sont responsables de la rougeur, la douleur, la fièvre et de l'œdème. Ils provoquent la vasodilatation, la contraction des cellules endothéliales des veinules post capillaire et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. La prostaglandine PGE2 facilite l'action des médiateurs de la douleur, elle inhibe l'activité des lymphocytes T suppresseurs, augmente la production d'immunoglobulines et diminue la production d'IL2 par les lymphocytes (**Larsen et al., 2015**). Les leucotriènes sont des médiateurs important de l'allergie et des réactions inflammatoires. Ils augmentent la perméabilité vasculaire et participent avec d'autres médiateurs comme les prostaglandines à la formation de l'œdème. Ce sont des agents chimiotactiques pour les polynucléaires neutrophiles. (**Crea et al., 2015**). La thromboxane synthétisée principalement par les plaquettes par voie de COX 1, entraîne l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction, la prolifération des cellules musculaires lisses et la contraction des cellules endothéliales. La prostacycline est produite par les cellules endothéliales grâce à la prostacycline synthase, elle joue un rôle d'un vasodilatateur et anti agrégeant plaquettaire. Le facteur activant les plaquettes (PAF) est un autre médiateur cellulaire joue un rôle important dans l'agrégation plaquettaire, l'activation des phagocytes, la vasodilatation et l'élévation de la perméabilité de l'endothélium, Il est produit lors de l'activation des plaquettes; mais aussi par les cellules endothélial, les macrophages, les polynucléaires et les monocytes à partir d'un précurseur inactif le lyso-PAF sous l'action de deux enzymes la phospholipase A₂ et l'acétyl transférase (**Voet et Voet, 2005**).

- **Les amines vasoactives**

Certaines amines à propriétés vasoactives telle que l'histamine et la sérotonine peuvent agir comme des médiateurs de l'inflammation. L'histamine, est une amine synthétisée essentiellement dans les basophiles et les mastocytes où elle est stockée dans les granules cytoplasmiques. Elle est aussi synthétisée dans les plaquettes, les neurones

histaminergique, les lymphocytes et les cellules d'enterochromaffine de l'intestin. Sa sécrétion est déclenchée par des facteurs multiples tels que les complexes allergène-IgE, les anaphylatoxines C3a et C5a du complément. L'action de l'histamine (H) est rapide, elle réagit par l'intermédiaire de 3 types de récepteurs membranaires spécifiques : H₁, H₂ et H₃. C'est par l'intermédiaire des récepteurs H₁ que l'histamine intervient dans la réaction inflammatoire. La sérotonine est synthétisée par les cellules d'enterochromaffine de l'intestin grêle, sa libération est en faveur de l'activation plaquettaire (**Duerschmied et al., 2013**). La sérotonine comme l'histamine provoque une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et engendre des sensations de douleur et des œdèmes (**Silbernagl et Lang, 2005**).

- **Les Cytokines**

Les cytokines regroupant un ensemble de protéines ou de glycoprotéines de faible poids moléculaires sont sécrétées par les cellules inflammatoires (les phagocytes, les lymphocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes...etc.) et sont impliquées dans la communication inter cellulaire. Elles sont activées pendant le contrôle de la prolifération, la maturation et la différenciation des cellules hématopoïétique et interviennent également dans la réponse inflammatoire et dans le mécanisme de l'immunité innée (**Tableau I**).

Les cytokines sont classées en chimiokines, interleukines et interférons. Les chimiokines sont des petits polypeptides sécrétés par les monocytes/les macrophages et les plaquettes. Ce sont des chimioattractants qui permettent le recrutement des lymphocytes T pendant l'inflammation. Leurs actions se font via des récepteurs transmembranaires couplés à la protéine G. (**Akcay et al., 2009**). Les interleukines sont des médiateurs de communication intercellulaire qui jouent un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire soit par une fonction activatrice pro-inflammatoires en intervenant dans les processus d'adhérence à l'endothélium, le déplacement orienté des cellules de l'inflammation vers le site de l'agression et dans la phagocytose. C'est le cas des interleukines; IL-1, IL-6 et TNF- α . Soit par effet anti-inflammatoire en inhibant de la synthèse des interleukines pro-inflammatoires. IL-4, IL-13, IL-10 et TGF- β sont des exemples d'interleukines anti-inflammatoires les mieux connues. D'autres cytokine comme les interférons IFN- α et IFN- β et IFN- γ) sont responsables de la défense antivirale de l'organisme (**Weill et Batteux, 2003**).

Tableaux I : Sources et rôles de quelques cytokines intervenant dans la réponse inflammatoire

Cytokines	Source	Rôle	Références
IL-1 (17kDa)	Monocyte/macrophages, les lymphocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, et les cellules Epithéliales	Joue un rôle dans l'induction de la réponse immunitaire innée et spécifique des cellules LT et LB, il active l'expression de nombreux gènes de synthèse des médiateurs inflammatoire, Stimule aussi la production des protéines de l'inflammation par les hépatocytes et favorise la prolifération des fibroblastes	Weill. et Batteux, 2003 ; Sherwood et al., 2004 ; Charles et al., 2010
IL-6 (26kDa)	Monocyte/macrophages, Cellules LT et les Fibroblastes	Provoque la différenciation des LB en plasmocytes produisant des anticorps, stimule la prolifération des LT et diminue la production d'IL-1	
IL-8	Monocytes, macrophages, fibroblastes et les cellules endothéliales	Déplacement orienté des leucocytes circulants vers un foyer inflammatoire. et activation des polynucléaires avec induction de cyclooxygénase, de lipooxygénase	
IL-15 (14/15kDa)	Monocyte, Fibroblaste Cellules dendritique	Induction de la prolifération des lymphocytes T (CD-8)	
TNF-α (17kDa)	Macrophages/monocytes, LT, LB, les Cellules épithéliales, les cellules endothéliales, basophiles, Fibroblastes	Induction de la synthèse des cytokines et des prostaglandines, augmente la capacité de phagocytose, induction de la formation de superoxyde par les LB, active la migration des T cytotoxiques. induit la synthèse des IL1 et IL-6 et augmentent la perméabilité vasculaire	

- Les radicaux libres

En réponse à un agent pathogène, les cellules phagocytaires (les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les monocytes) libèrent des espèces très réactives de l'oxygène (ERO) (**figure2**) et de l'azote (ERN) (**Govindarajan et al., 2005**). Ces derniers jouent un rôle fondamental dans la destruction rapide des microorganismes. D'autres cellules non phagocytaires associées à l'inflammation (fibroblastes, cellules endothéliales...) sont connues pour produire des ERO et ERN, les radicaux libres sont le plus souvent produits par la chaîne de transport d'électron mitochondriale, le cytochrome P 450 et la xanthine oxydase. Ces espèces réactives permettent entre autre la régulation du fonctionnement des cellules vasculaires, elles interviennent également dans l'adhésion et la migration transendothéliale des leucocytes vers le site inflammatoire et l'inhibition de la formation des thromboses (**Kvietys et Grangerb, 2012**).

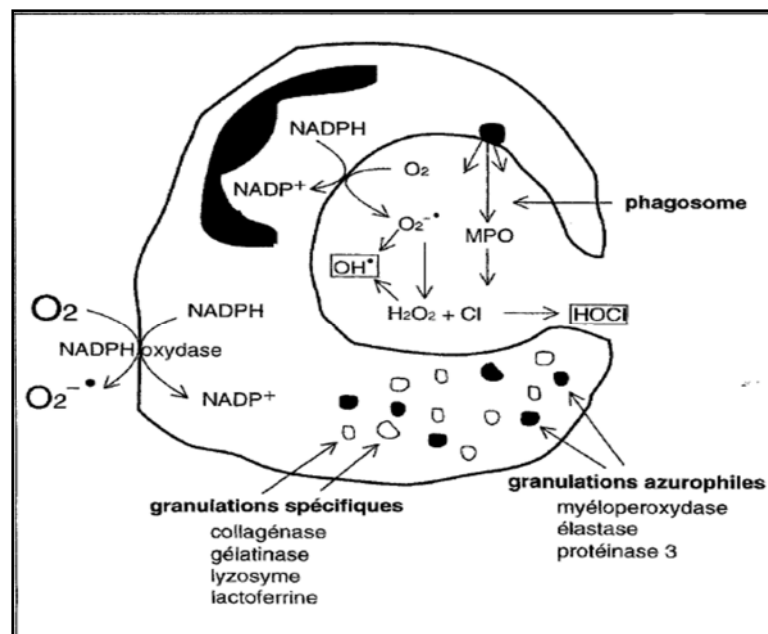


Figure2: Libération des radicaux libres oxygénés par les macrophages (**Pascier, 1995**).

Les espèces réactives d'oxygène ou de l'azote peuvent exercer des effets toxiques dans le cas de leur surproduction par les phagocytes à différents niveaux soit par désorganisation de la membrane par peroxydation lipidique; par des altérations protéiques ou chromosomique (**Lavie, 2009**).

I.1.4-Types d'inflammation

La réponse inflammatoire est subdivisée en deux types une inflammation aigue et chronique. Ces deux réponses sont associées au système immunitaire.

I.1.4.1-Inflammation aigue

C'est une réponse immédiate caractérisée par une courte durée de vie, une fièvre parfois élevé et une augmentation du taux des protéines sériques. Elle est causée par l'activation des cellules spécialisées comme les granulocytes et les mastocytes qui sont présentes dans le site infecté (**Pawelec et al., 2015**). Elle se déroule en trois grandes phases successives ; la phase de vascularisation déterminé par des modification de la microcirculation locale, la phase cellulaire caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés et la phase de résolution et de cicatrisation qui permet le retour à l'homéostasie du tissu lésé (**Bartton et al., 2008**).

- **Phase vasculaire**

La première étape qui suit immédiatement la lésion consiste à une vasodilatation artériolaire qui apparait très rapidement après une brève vasoconstriction. Il en résulte une augmentation du flux sanguin se traduisant cliniquement par une chaleur et une augmentation de la perméabilité vasculaire due à un agrandissement des pores de la membrane des capillaires (**O'Connor et Nichol, 2015**). Une fuite de fluide des vaisseaux sanguins vers les tissus est donc provoquée ce qui explique l'œdème et la douleur associé à la réaction inflammatoire. Cette extravasation consiste au premiers temps à une margination des leucocytes qui s'adhèrent à la paroi endothéliale dans les heures qui suivent l'agression (**Letonturier, 2007**) et déclenché par le roulement des neutrophiles sur l'endothélium vasculaire par une interaction entre les selectines avec P-selectinglycoprotein ligand 1 (PSGL1). Il s'ensuit une interaction ultérieure entre les integrines LFA-1 et les molécules (ICAM 1, VCAM) ce qui leurs permette de s'adhérer fermement aux cellules endothéliales (**Ley et al., 2007**).

IL-1 β et le TNF- α sont des cytokines activatrices qui stimulent la production du facteur PAF, des prostaglandines et de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales. Ils contribuent à réduire le débit sanguin par leur action vasodilatatrice ce qui, ce qui favorise le

déplacement des leucocytes sur l'endothélium puis leurs passages à travers les jonctions de la barrière endothéliale (Sherwood et Toliver-Kinsky, 2004).

- **Phase cellulaire**

Après avoir créé un environnement propice à la mise en place des systèmes de défense, la lutte contre les microorganismes peut avoir lieu ce qui conduit à l'élimination de l'agent infectieux. Les polynucléaires neutrophiles constituent les premiers agents de défense mis en place. Ces cellules exercent leurs fonction par phagocytose sous l'effet de plusieurs enzymes tels que les hydrolases, les cathepsines G et des protéinases-3 (Bartton *et al.*, 2008). Les macrophages issus des monocytes sont par la suite recrutés en second lieu et épaulent les neutrophiles dans leur activité phagocytaire en phagocytant les corps apoptotiques issus des neutrophiles. En fin, les mastocytes intervient par phagocytose pour l'élimination des certains bactéries mais avec un impact mineur à coté de celui des phagocytes professionnelles ce qui conduit à l'élimination de l'agent pathogène (Espinosa et Chillet, 2010).

- **Phase de réparation**

La résolution de l'inflammation est un processus permettant le retour à l'homéostasie du tissu lésé. (Matthew Spite *et al.* , 2011).les agents pathogènes sont éliminées par les polynucléaires neutrophiles et les débris cellulaires sont phagocytées par les macrophages. Ces derniers vont sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Les cellules endothéliales favorisent la réparation de l'endothélium par la production et le remodelage des éléments de leur stroma ou de leur lame basale. D'autres cellules vont intervenir pour réparer le tissu atteint. Dans le cas d'une lésion grave, les macrophages vont participer à l'angiogenese et les fibroblastes vont permettre la reconstruction des tissu en produisant les protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène, la fibronectine et la laminine (Weill et Batteux, 2003).

I.1.4.2-Inflammation chronique

L'inflammation chronique est définie par la présence des lymphocytes, macrophages, et des cellules de plasma dans le tissu infecté. Elle est causée par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, le rejet de l'allogreffe chronique et dans l'inflammation granulomateuse. Dans beaucoup de cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pour de long période (mois ou année)

L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes sur l'endothélium vasculaire permettant leur transmigration dans les compartiments extravasculaires (Serhan et al., 2010).

I.1.5-Pathologies inflammatoires

De nombreuses maladies inflammatoires sont liées aux mécanismes d'inflammation précédemment cités. Chaque maladie se différencie d'une autre par son étiologie et par ces manifestations cliniques (Tableau II).

Tableau II : Exemples de maladies liées à l'inflammation

Maladies liées à l'inflammation	Caractéristiques	Références
Rhumatisme articulaire	Maladie inflammatoire chronique auto-immune caractérisée par une érosion locale des os, sécrétion de grandes quantités de cytokines par les ostéoblastes	Pathak et al., 2014
Arthrose	Processus inflammatoire articulaire de dégradation enzymatique du cartilage	Courties et Sellam, 2014
Artériosclérose	Maladie cardiovasculaire caractérisé par l'oxydation de LDL, libération des facteurs chimiotactiques, cytokines et facteurs de croissance	Mlakar et al., 2014
Goutte	Inflammation articulaire déclenchée par des microcristaux d'urate de sodium, augmentation des protéines sérique d'inflammation, une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles et une fièvre parfois élevée éventuellement avec des frissons	Martinon et al., 2006
Obésité	Maladie chronique caractérisé par l'accumulation des graisses viscérale et sous cutané due à un dysfonctionnement endothélial	Fina Loveren et al., 2015)

I.2- ANTI-INFLAMMATOIRES

I.2.1-Généralités

Bien que le développement d'une réponse inflammatoire efficace puisse jouer un rôle important dans la défense de l'organisme, cette réponse peut se faire au détriment de ce dernier. Diverses approches thérapeutiques sont disponibles pour réduire les réponses inflammatoires de longue durée et donc les complications qui leur sont associées (**Kindt et al., 2008**). C'est le cas de l'utilisation des substances anti inflammatoires. Ces dernières appartiennent à des classes chimiques très variées, elles agissent de façon symptomatique sur l'agent agresseur, elles sont divisées en trois grandes classes : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et les anti inflammatoires d'origine végétale (**Muster, 2005**) (**Tableau III**).

Les anti inflammatoires non stéroïdiens constituent l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le cadre de la prescription médicale ou de celui de l'automédication (**Jouzeau et al., 2004**). Ce sont des arylacides fonctionnalisés soit par un groupe acide carboxylique, soit par un groupe acide énoïque, ils possèdent une forte fixation aux protéines plasmatiques et une large distribution tissulaire. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens représentent diverses activités pharmacologiques de type analgésique, antipyrétique et anti- plaquettaire ainsi que des effets secondaires gastro-intestinaux et rénaux (**Pillon, 2014**).

Les anti-inflammatoires stéroïdiens, également appelés corticostéroïdes sont des dérivés synthétiques des corticostéroïdes naturelles, hormone sécrétée par les glandes corticosurrénales à partir de cholestérol sous l'action de l'hormone adrénotropine (ACTH) de l'hypophyse, cette dernière est sous la dépendance du facteur de libération de la corticotropine (CRF) produite par l'hypothalamus (**Weill et Batteux, 2003**).

L'utilisation des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens n'est pas sans inconvénient sur l'organisme. Le retour à la médecine traditionnelle pour les besoins en santé contribue à éviter les effets nocifs de ces molécules. Les plantes médicinales représentent une importante composante de la médecine traditionnelle largement utilisées ; plusieurs plantes sont utilisées seules ou en synergie avec d'autres plantes pour le traitement des maladies inflammatoires. Les molécules dotées d'un effet anti-inflammatoire dans les plantes sont principalement les polyphénols, les stérols et les terpènes. Quelques exemples de ces plantes sont cités dans le Tableau IV.

Tableau III: Tableau recapulatif de quelques exemples d'anti-inflammatoires (Muster, 2005).

Anti-inflammatoires non stéroïdiens		
Nature chimique	Dénomination commune internationale	Spécialité
Salicylés	Acide acetylsalicylique	Asperine
Acide arylcarboxylique	Ibuprofène	Brufen
Acides anthraniliques	Acide ketoprofène	Profenid
Coxibs	Célécoxibs	Celebrex
Oxicams	Piroxicam	Feldène
Indoliques	Indometacines	indocid
Pyrazolés	phénylbutazone	Butazolidine
Anti-inflammatoires stéroïdiens		
Nature chimique	Spécialité	
Cortisol	Hydrocortisone	
Prednisone	Cortancyl	
Prednisolone	Solupred	
Bétaméthasone	Betnesol	
Dexaméthasone	Dectancyl	
Triamcinolone	Kénacort retard	

Tableaux IV : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-inflammatoire.

Nom scientifique	Famille	Partie utilisé	Mode d'action	Utilisation	Références
<i>Daniellia oliveri</i>	Fabaceae	Feuilles	Inhibition de la synthèse de la sérotonine, des prostaglandines, des kinines et des protéases.	Tuberculose et Maux de tête	Tianga Yaya et al., 2015
<i>Pergularia daemia</i>	Apocynaceae	Racines	Inhibition de la cyclooxygénase	Diarrhée infantile.	Bhaskar et Balakrishnan, 2009.
<i>Saba senegalensis</i>	Apocynaceae	Tiges Feuilles	Inhibition de la 5-ipoxygenase.	Antalgique et antiœdémateux.	Yougbaré-Ziébrou et al., 2015
<i>Canthium parviflorum</i>	Rubiaceae	Racines et Feuilles	Inhibition de la dénaturation des protéines (BSA)	Anémies, douleurs dentaires et toux	Karthik et al., 2013
<i>Pogostemon plectranthoides</i>	Lamiacées	Feuilles	Inhibition de la dénaturation des protéines, stabilisation de la membrane	Maladies de la peau	Suganya et al., 2015
<i>Indigofera pulchra</i>	legumineuses	Parties aériennes	Inhibition de la COX-1	Algodystrophie	Larsen et al., 2015
<i>Jasminum dichotomum</i>	Oleaceae	Feuilles	Inhibition de la COX-1	Algodystrophie	

Tableau IV (suite) : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-inflammatoire.

Nom scientifique	Famille	Partie utilisé	Mode d'action	Utilisation	Référence
<i>Scoparia dulcis L.</i>	Plantaginaceae	Parties aeriennes	Inhibition de la COX-1	Otite	Larsen et al., 2015
<i>Solanum americanum</i>	solanaceae	Parties aeriennes	Inhibition de la COX-1	Douleurs rhumatismales	
<i>Stachytarpheta indica L.</i>	verbenaceae	Parties aeriennes	Inhibition de la COX-1	Inflammations des yeux	
<i>Tiliacora warneckeii</i>	meliaceae	Ecorce	Inhibition de la COX-1	douleurs	
<i>Triumfetta rhomboidea</i>	Malvaceae	Racines	Inhibition de la COX-1	Domages induits dans les muscles, douleurs	
<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	Rutaceae	Racine, écorce	Inhibition de la COX-1	Douleurs rhumatismales et les douleurs dentaires.	

I.2.2-Mode d'action des anti-inflammatoires

- **Actions des anti-inflammatoires non stéroïdiens**

Le mécanisme d'action des AINS repose essentiellement sur l'inhibition de l'activité des deux enzymes de la voie cyclooxygénase; la COX-1 et COX-2, ce qui conduit à une diminution de la production des prostanoides (**Pillon, 2014**). La réduction de la production des prostaglandines limite l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le chimiotactisme des neutrophiles lors de la réponse inflammatoire (**Kindd et al., 2008**). Les AINS possèdent des activités analgésiques qui se traduisent par une diminution de la sensation des terminaisons nerveuses. Ils sont également des antipyrétiques et semblent être responsables du règlement du centre thermorégulateur de l'aire pré-optique de l'hypothalamus antérieur. En cas de fièvre, leurs concentration augmente dans le liquide céphalo-rachidien, les prostaglandines seraient libérées dans le système nerveux central par l'action du pyrogène endogène (ou bactérien). Les AINS rétablissent ainsi le point d'équilibre du centre thermorégulateur à une valeur physiologique, l'abaissement de température est dû à une augmentation de la thermolyse par sudation et la vasodilatation périphérique. Les AINS ont aussi des propriétés antiagrégants plaquettaires dues à l'inhibition de la synthèse des thromboxanes A₂, un puissant proagréant synthétisé lors de l'activation plaquettaire (**Pillon, 2014**).

- **Action des anti-inflammatoires glucocorticoïdiques**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens sont des substances lipophiles qui ont la possibilité de diffuser passivement à travers les membranes cytoplasmique et d'atteindre leurs récepteurs spécifiques appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes libérant des molécules chaperons dont (HSP 90, 70) (protéine de choc thermique). La formation du complexe glucocorticoïde-récepteur a lieu dans le cytoplasme, puis celui-ci migre vers le noyau où il se fixe aux éléments de réponse aux glucocorticoïdes situées aux niveaux de sites spécifiques de l'ADN et exerce leur action soit par transactivation ou transrepression des gènes cibles (**Weill et Batteux, 2003**). Cela conduit à inhibition de différentes étapes de la réaction inflammatoire. Tels que, l'inhibition des phénomènes vasculaires de processus inflammatoire par leur effet antiprolifératif sur nombreuses cellules impliquées dans la réponse innée comme les monocytes, les macrophages et également sur les cellules de l'immunité adaptative tel que les lymphocytes mais aussi sur d'autres cellules (les fibroblastes

et les polynucléaires neutrophiles) (**Muster et al., 2005**). Ces anti-inflammatoires contrôlent l'œdème, la migration des leucocytes pour atteindre le foyer inflammatoire et la phagocytose. Les glucocorticoides inhibent également la phospholipase A2, la production des médiateurs inflammatoires comme les prostaglandines, les leucotriènes, le PAF-acether et les radicaux libres. Ils peuvent moduler la neuroinflammation notamment par induction de l'apoptose, la répression des médiateurs pro-inflammatoires et la production des cellules suppressives (**Dejean et Richard, 2013**).

Matériel et méthodes

II.1-EXTRACTION ET QUANTIFICATION DES POLYPHENOLS DANS LES EXTRAITS ETHANOLIQUES DES FEUILLES DE CITRUS

II.1.1-Préparation du matériel végétal

Sept variétés du genre *Citrus* (famille des rutacées); variétés Thomson, Tardive, Sanguinelli et Double fine de l'espèce *C. sinensis*; variétés Clémentine et Wilking de l'espèce *C. reticulata* et variété Citron de l'espèce *C. limon* ont été utilisées dans cette étude. Ces variétés sont cultivées dans une station agricole de Timezrit dans la commune Sidi Aich, Wilaya de Bejaia (latitude (Nord) :36°36'54.57'' ; longitude (ouest) : 4°46'29. 70''; altitude : 670). Une fois récoltées, les feuilles de ces différentes variétés de citrus ont été nettoyées et lavées à l'eau courant, séchées à l'étuve (40°C) pendant une semaine, réduites en poudre à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisée pour obtenir une poudre fine et homogène d'un diamètre $\leq 125\mu\text{m}$. Pour préserver l'intégrité de leurs molécules, les poudres ont été ensuite conservées dans des récipients en verre et hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à utilisation.

II.1.2-Extraction éthanolique

Afin d'extraire les substances bioactives contenus dans la plante, notamment les composés phénoliques et flavonoïques, la poudre végétale préparée a été soumise à une extraction solide/liquide à l'éthanol par macération à température ambiante suivant le protocole décrit par **Benhammou et al, 2008**. Vingt gramme de poudre végétale ont été mises à macérer dans un volume de 100 ml d'éthanol absolue à température ambiante pendant 5 jours. Le macérât ainsi obtenu été filtré sur papier wattman (porosité 0.3nm) puis le solvant organique a été évaporé à l'air libre sous hôte chimique pendant 10 jours. Pour éliminer toute trace de solvant, l'extrait sec a été mis à l'étuve (40°C) pendant 24 heures.

➤ Expression du rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction correspondant au rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant et la masse de la poudre végétal utilisée :

$$R(\%) = (Me / Mp) \times 100$$

R(%): Rendement en %, **Me**: Masse de l'extrait sec (en g), **Mp**: Masse de la poudre végétale utilisée pour l'extraction (en g).

II.1.3-Analyse quantitative des polyphénols

L'analyse quantitative des polyphénols, métabolites secondaires bioactifs, dans les extraits éthanoliques des feuilles de citrus a été réalisée par méthodes colorimétriques.

II.1.3.1-Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu. C'est une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation d'un réactif spécifique au groupement phénols ; le réactif Folin-ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Les polyphenols réduisent ce réactif en un complexe constitué d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) ayant une couleur bleue. L'intensité de la coloration bleue obtenue dont le maximum d'absorption est à 760 nm est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (**Ribéreau-Gayon, 1972**).

➤ Mode opératoire

Le protocole que nous avons suivi pour le dosage des polyphénols totaux contenus dans nos extraits est celui décrit par **Ryan (2013)**. Un volume de 200 µl de l'extrait des feuilles de citrus solubilisé dans l'éthanol (1mg/ml) a été mélangé avec 1.5 ml de réactif Folin-Cioclatau (0.1 N). Le mélange a été incubé pendant 5 mn à l'obscurité puis 1,5 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 6 % lui a été additionnés. Après agitation et incubation à température ambiante pendant 2 heures, l'absorbance (Abs) a été mesuré à 765 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions mais ne contenant pas d'extrait végétale. Les mesures ont été réalisées trois fois de façon indépendante.

➤ Expression des résultats

Pour exprimer la quantité des polyphénols présents dans l'extrait végétal, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard (**AnnexeI**). Les concentrations en phénols totaux déterminées à partir de cette courbe sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mgEqAG/gMS).

II.1.3.2-Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par colorimétrie en utilisant comme réactif spécifique le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes qui possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position C₃ ou C₅ sont susceptibles de donner en présence de chlorure d'aluminium, par chélation de l'ion Al⁺³ un complexe jaunâtre (**figure9**) qui présente un maximum d'absorbance à 448nm. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait (**Quettier et al., 2000**).

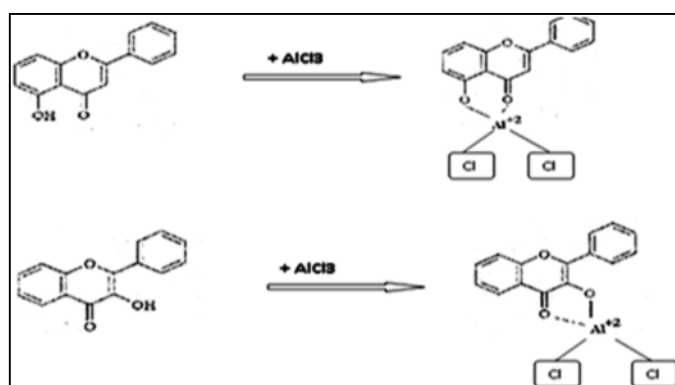


Figure 3: Chélation de trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (**Quettier et al., 2000**).

➤ Mode opératoire

Pour doser les flavonoïdes, nous avons suivi le protocole décrit par **Djeridane et al., (2006)**. Un volume de 1 ml de la solution d'extrait végétale (1mg/ml) a été mélangé avec 1ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2%. Le mélange a été vigoureusement agité puis incubé à l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance est ensuite lue à 448nm contre un témoin préparé dans les mêmes conditions et ne contenant pas d'extrait de feuilles de citrus. Le dosage a été réalisé trois fois de façon indépendante.

➤ Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes contenus dans les différents extraits de citrus est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mgEqQ/gMS) en se référant à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions avec la quercétine comme flavonoïde standard (**AnnexeI**).

II.2-ETUDE *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTI-THERMODENATURANTE DES EXTRAITS ETHANOLIQUES DES FEUILLES DE CITRUS

Pour estimer l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes, un test de l'évaluation *in vitro* de la capacité de ces extraits à inhiber la dénaturation thermique d'une protéine globulaire soluble par turbidimétrie a été mise au point. En effet, La chaleur provoque la perte réversible des structures tertiaires et même secondaires des protéines (Adarsh Verma et al., 2011) qui se manifeste par la diminution de leurs solubilités. Pour évaluer l'activité des extraits de citrus pour leurs effets anti-thermodénaturant des protéines, l'ovalbumine extraite du blanc d'œuf a été utilisée comme modèle.

II.2.1-Extraction de l'ovalbumine

L'extraction de l'ovalbumine à partir du blanc d'œufs de poule a été réalisée suivant le protocole décrit par Anderson (2013). Un œuf a été cassé soigneusement et le jaune est séparé du blanc en passant le jaune entre les deux moitiés de la coquille. Dans un bécher mis dans un bain de glasses, un blanc d'œufs a été mélangé à 50ml du tampon phosphate (0.1M, PH=6.6) et homogénéisé sous agitation magnétique pendant 5mn. L'homogénat obtenu d'aspect trouble a été ensuite centrifugé à 3000 rpm (4°C) pendant 5 mn puis filtré sur bande à gaz pour éliminer les globulines précipitées. Le filtrat obtenu, enrichi en ovalbumine, a été ensuite fractionné en des aliquotes de 3ml et congelé à -20°C.

II.2.2-Mise au point du protocole d'étude de la dénaturation thermique de l'ovalbumine

Pour évaluer l'activité anti-thermodénaturante de l'ovalbumine des extraits de citrus, la méthode décrite par Karthik et al., 2013 a été réalisée.

Préalablement, il fallait réaliser des tests pour déterminer les concentrations d'ovalbumine et d'éthanol à utiliser dans l'expérience.

➤ Effet de la concentration de l'ovalbumine

Un volume de 5 ml d'ovalbumine de blanc d'œuf à différentes dilutions (1/100, 1/75 et 1/50) a été mélangé avec 250 µl de tampon phosphate (0.1 M, pH 6.6) puis incubé dans un bain marie à 70°C±2 pendant 30mn. Les densités optiques (DO) ont été ensuite lues avant (t=0) et après incubation (t=30mn) à 416 et à 660nm respectivement.

➤ **Effet de la concentration d'éthanol**

Etant donné que dans les essais d'inhibition, nous utiliserons des extraits de citrus solubilisés dans l'éthanol, l'effet de la concentration d'éthanol (5%, 2.5% et 1%) sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine à la dilution 1/50 a été testé dans les conditions expérimentales précédemment citées.

II.2.3- Evaluation de l'Effet anti-thermo dénaturant des extraits de citrus

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 250 µl de chaque extrait de citrus solubilisé dans l'éthanol à des concentrations de 0.238mg/ml, 0.095mg/ml et 0.047mg/ml ont été mélangés à 5 ml de la solution d'ovalbumine diluée au 1/50 dans du tampon phosphate 0,1M, pH= 6,6. Le mélange a été mis à incuber dans un bain marie à 70°C±2 pendant 30mn. Les densités optiques ont été lues à 660nm avant et après incubation. Le contrôle a été préparé dans les mêmes conditions réactionnelles en remplaçant l'extrait par un même volume d'éthanol (Karthik et al., 2013).

Pour comparer, l'efficacité des extraits testés à un anti-inflammatoire de standard, un essai a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires avec le diclofinac de sodium aux concentrations de 0.238mg/ml, 0.095mg/ml et 0.047mg/ml.

➤ **Expression des résultats**

Le taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine à 70°C est exprimé par l'expression suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\Delta\text{Absc} - \Delta\text{AbsE}}{\Delta\text{Absc}} \times 100$$

Où :

ΔAbsc : variation d'Absorbance à 660nm de l'ovalbumine en absence d'extrait de citrus (contrôle) et ΔAbsE : variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine en présence de l'extrait de Citrus (essai).

II.3-EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-HEMOLYTIQUE DES EXTRAITS ETHANOLIQUES DES FEUILLES DE CITRUS

Pour évaluer l'activité anti-hémolytique des extraits éthanoliques de feuilles de citrus, la capacité de ces extraits à stabiliser la membrane des globules rouges vis-à-vis de l'attaque par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (James et Alewo, 2014) ou par le détergeant non ionique; le tritonX100 (Muthu et Durairaj, 2015) a été déterminé *in vitro*. Les tests d'évaluation utilisés reposent sur la mesure par méthode spectrophotométrique de l'hémoglobine libérée (couleur rouge) suite à la rupture de la membrane des globules rouges (James et Alewo, 2014).

II.3.1-Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang traité et testé a été obtenu à partir du centre de transfusion sanguine de la wilaya de Bejaia (CWTS). Une suspension érythrocytaire de 10% a été préparée comme décrit par Hebbani et al, (2014). Du sang prélevé à l'aide d'une seringue graduée dans des tubes secs a été centrifugé à 3000 rpm pendant 5 mn pour séparer les GR du plasma. Le culot contenant les GR a été ré-suspendu et lavé 6 fois avec de l'eau physiologique à 0,9 % préchauffé au bain Marie à 37°C. L'opération de lavage a consisté en une série de centrifugation à 3000rpm (5min) et suspension du culot dans l'eau physiologique à 0.9%,(37°C). A la dernière centrifugation, un volume du culot a été additionné à 9 volume de tampon phosphate salin (0,2M à un pH de 7,4) pour obtenir une solution érythrocytaire d'hématocrite à 10%.

II.3.2-Détermination de l'effet anti-hémolyse induite par le tritonX100

II.3.2.1-Mise au point du test de l'hémolyse induite par le triton X100

L'activité anti-hémolytique des extraits éthanoliques des feuilles de citrus vis avis de l'hémolyse induite par le tritonX100 a été évaluée en suivant le protocole de Muthu et Durairaj (2015). Avant de tester l'effet hémolytique des extraits de citrus, ce protocole expérimental a été adapté. Pour cela, les effets de la concentration du triton X100, d'une part, et de la concentration de l'éthanol, d'autre part, ont été étudiés.

➤ **Effet de la concentration du triton X100**

Un volume de 800µl du triton X100 à différents concentrations (1%, 0,1%, 0.5% et 0.05%) a été mélangé et homogénéisé délicatement avec 2,2 ml du tampon phosphate (0,2M, pH 7,4). 500µl de la suspension érythrocytaire (10%) ont été ensuite mélangés à l'émulsion et laissés incubée à 37°C pendant une heure puis centrifugé à 3000 rpm pendant 5mn. Les surnageant sont récupérés et les densités optiques sont lues à 541nm. Les essais ont été réalisés trois fois. L'essai contrôle a été fait dans les mêmes conditions en absence du triton X100 (Muthu et Durairaj, 2015).

➤ **Effet de la concentration de l'éthanol**

Etant donné que les extraits de citrus à tester seront solubilisés dans l'éthanol, l'effet de la concentration de ce solvant sur l'hémolyse a été évalué. Des concentrations finales en éthanol entre 1% et 3% ont été testées dans les mêmes conditions citées ci-dessus. Les essais ont été réalisés trois fois. L'essai contrôle a été fait dans les mêmes conditions réactionnelles en absence d'éthanol.

II.3.2.2-Mesure de l'effet inhibiteur de l'hémolyse des les extraits de citrus

Dans des tubes à hémolyse, un volume de 50µl d'extrait éthanoliques des feuilles de citrus à concentrations (0.11mg/ml, 0.08mg/ml et 0.044mg/ml) a été mélangé à 800µl d'une solution de triton X100 (0.05%) et complété à un volume de 3 ml avec du tampon phosphate (0,2M, pH 7,4). 500 µl de la suspension érythrocytaire (10%) ont été ensuite additionnées dans chaque tube. Puis, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 1 heure. Après centrifugation à 3000rpm pendant 5mn, les densités optiques des surnageant ont été lues à 541nm. Le test contrôle a été préparé dans les mêmes conditions en absence d'extrait végétal (Muthu et Durairaj, 2015).

II.3.3-Détermination de l'effet inhibiteur de l'hémolyse induite par peroxyde d'hydrogène des extraits de citrus

L'effet inhibiteur de l'hémolyse par les extraits de citrus a été dévalué par le protocole décrit par James et Alewo (2014). 2ml de la suspension érythrocytaire (4%) ont été mélangés à 2 ml du tampon phosphate (0.2M, pH7.4) contenant ou non l'extrait végétal à différentes concentrations (0,11mg/ml, 0,08mg/ml, et 0,044mg/ml). Le mélange a été pré-incubé à

température ambiante pendant 5 mn puis 500µl de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 10 volume ont été ajoutés. Le mélange réactionnel ainsi obtenu a été par la suite incubé à 37°C pendant 4heurs puis centrifugé à 3000 rpm pendant 10 mn. Après centrifugation, les densités optiques des surnageants ont été lues à une longueur d'onde λ=541 nm.

La quercétine a été utilisé comme polyphénol anti-hémolytique standard. Des essais anti-hémolytiques avec des concentrations de quercétine de 0,11mg/ml, 0,08mg/ml et 0.044mg/ml ont été réalisés dans les mêmes conditions précédemment décrites.

➤ Expression des résultats

Le taux d'inhibition de l'hémolyse (%) est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Absc} - \text{Abse}}{\text{Absc}} \times 100$$

Ou' :

Absc : Absorbance à 541nm de l'hémoglobine libérée en absence d'extrait de Citrus (contrôle).

Abse : Absorbance à 541nm de l'hémoglobine libérée en présence de l'extrait de Citrus (essaie).

❖ Etude statistique :

Une étude statistique a été effectuée en utilisant l'Excel afin de déterminer les corrélations entre l'activité anti-dénaturante de la protéine de l'ovalbumine et les teneurs en composés phénoliques des extraits éthanoliques des feuilles de citrus ; entre l'activité anti-hémolytique et les teneurs en composés phénoliques des mêmes extraits et entre l'activité anti-dénaturante et l'activité anti-hémolytique d'une part.

D'autre par d'autre études corrélatives entre l'activité anti-inflammatoire et l'activité antioxydant, entre l'activité anti-hémolytique et l'activité antioxydant ont été réalisées en prenant les résultats du test obtenu au niveau de laboratoire de biotechnologie végétale et d'ethnobotanique sur l'évaluation de l'activité antioxydants des extraits de citrus par le test de scavenging du radical DPPH (**AnnexeII**).

Résultats

III.1- TAUX D'EXTRACTION

L'extraction à partir des feuilles de citrus par macération à froid (température ambiante) à l'éthanol a donnée les taux en extrait sec suivants (**Tableaux V**) :

Tableau V: Taux d'extraction par macération dans l'éthanol des feuilles des différentes espèces et variétés de Citrus.

Genre	Espèce	Variété	Rendement %
Citrus	<i>C. sinensis</i>	Thomson	8.16
		Tardive	8.88
		Sanguinelli	8.48
		Double fine	8.56
	<i>C. reticulata</i>	Clémentine	7.84
		wilking	7.86
	<i>C. limon</i>	Citron	8.44

Les taux d'extraction à partir des feuilles de citrus ont montré que le rendement en extrait sec varie d'une espèce à l'autre. D'après les résultats du tableau, nous constatons que les taux d'extrait brute obtenus par macération dans l'éthanol à partir des différentes espèces étudiées varient entre 7.8 et 8.9%. La variété Clémentine (*C. reticulata*) est celle qui a donné le taux le plus faibles (7,84%).

III.2- TAUX DES POLYPHENOLS DANS LES EXTRAITS ETHANOLIQUES

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des extraits de citrus a été réalisée par méthodes colorimétriques spécifiques (**Ribéreau-Gayon, 1972, Quettier et al., 2000**). Les taux en polyphénols totaux et flavonoïdes dans ces extraits éthanoliques, exprimés en mgEqAG/gMS et en mgEqQ/gMS respectivement, montrent que les feuilles des variétés étudiées contiennent des quantités appréciables en métabolites secondaires de type polyphénoliques (**Tableau VI**).

Tableau VI: Teneur en polyphénols et en flavonoïdes des feuilles de différentes espèces de Citrus.

Genre	Espèce (Variété)	Phénols totaux (mgEqAG/gMS)	Flavonoïdes (mgEqQ/gMS)
<i>Citrus</i>	<i>C.sinensis</i> (Thomson),	09.55 ± 0.09	04.61 ± 0.19
	<i>C.sinensis</i> (Tardive)	11.20 ± 0.07	03.31 ± 0.06
	<i>C.sinensis</i> (Sanguinelli)	10.23 ± 0.12	01.97 ± 0.48
	<i>C.sinensis</i> (Double fine)	09.67 ± 0.44	03.63 ± 0.07
	<i>C. reticulata</i> (Clémentine)	10.11 ± 0.13	02.60 ± 0.13
	<i>C. reticulata</i> (wilking)	10.09 ± 0.07	02.90 ± 0.07
	<i>C. limon</i> (variété citron)	13.45 ± 0.09	03.06 ± 0.01

D'après ces résultats, on constate que le taux des polyphénols totaux et le taux des flavonoïdes varient légèrement d'une espèce à une autre. Les extraits de feuilles de l'espèce *Citrus limon* présentent un taux légèrement plus élevé en polyphénols totaux (13.45 ± 0.09 mg EqQ/gM, alors que c'est l'extrait de la variété Thomson (*Citrus sinensis*) qui montre le taux le plus élevé en flavonoïdes (04.61 ± 0.19 mg EqQ/gMS). La variété Sanguinelli (*C. sinensis*) est la moins riche en flavonoïdes (01.97 ± 0.48 mg EqQ/gMS).

III.3-Activités inhibitrice de la dénaturation de l'ovalbumine des extraits de citrus

III.3.1-Optimisation des paramètres influençant la dénaturation thermique

- **Effet de la concentration d'ovalbumine**

Les résultats de la variation de la dénaturation thermique, exprimé en variation de densité optique (ΔDO) à 416 et à 660nm, à différentes concentrations d'ovalbumine en fonction du temps sont présentés dans la figure 4.

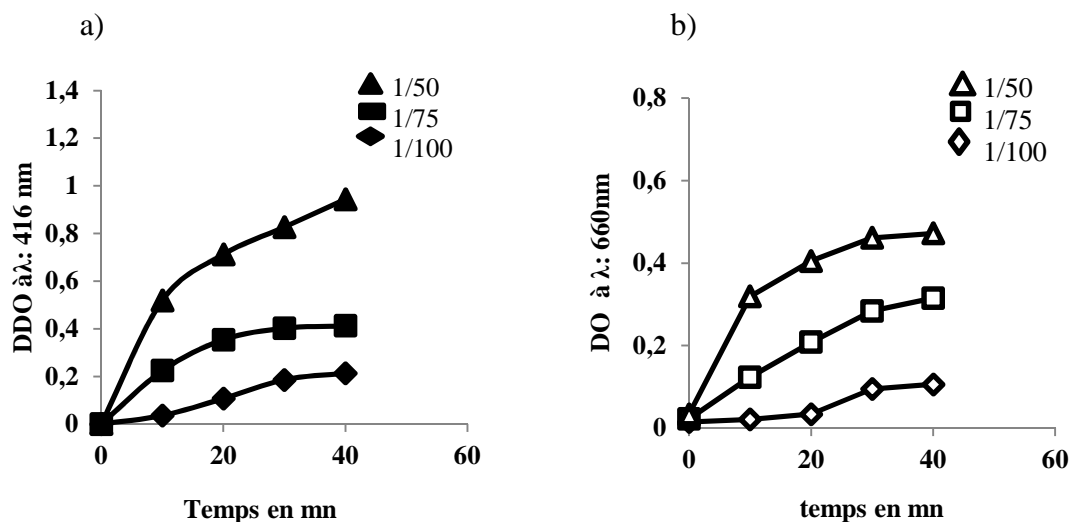


Figure 4 : Variation des DO de l'ovalbumine incubé à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations de la protéine. Mesure à λ : 416nm (a) et λ : 660nm (b).

Pas de grande variation des DO entre 30 et 40 mn. Plus la concentration de l'ovalbumine est élevée plus la variation des DO est grande et plus résolutif. Quelque soit la concentration de l'ovalbumine les valeurs de variations des DO aux différents temps de mesure à 660nm sont légèrement faibles que à 416nm

- **Effet de l'éthanol**

Les résultats de l'étude de l'effet de la concentration d'éthanol (1-5%) sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine à dilution 1/50 de l'extrait du blanc d'œuf, sont représentés dans le Tableau VII

Tableau VII: Effet de la concentration d'éthanol sur la dénaturation thermique d'ovalbumine.

Longueur d'onde	ΔDO			
	Sans éthanol	5%	2.5%	1%
λ : 416nm	0.703±0.006	0.384±0.008	0.589±0.003	0.691±0.0005
λ : 660nm	0.250±0.002	0.132±0.0030	0.177±0.015	0.215±0.0005

D'après ces résultats on constate que l'éthanol à 2,5% et 5% présente un effet thermo stabilisateur de d'ovalbumine. Alors que l'éthanol à 1% ne présente pas d'effet sur l'ovalbumine.

La variation des DO à 416nm sont supérieures qu'à 660nm et puis dans le reste des expériences on va tester des extraits ayant une possibilité d'absorber dans la région 416 nm, nous avons optés pour la réalisation des autres tests l'utilisation de la longueur d'onde 660 nm, la dilution 1/50 de l'ovalbumine et la concentration d'éthanol 5%.

III.3.2-Effets inhibiteurs de la dénaturation thermique de l'ovalbumine

- **Taux d'inhibition**

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des sept extraits éthanoliques des feuilles de Citrus, nous avons utilisé le test de l'inhibition de la dénaturation de l'ovalbumine des œufs de poule. Les taux d'inhibition obtenus à différentes concentrations de nos extraits de citrus sont représentés dans la figure suivante (**Figure 5**).

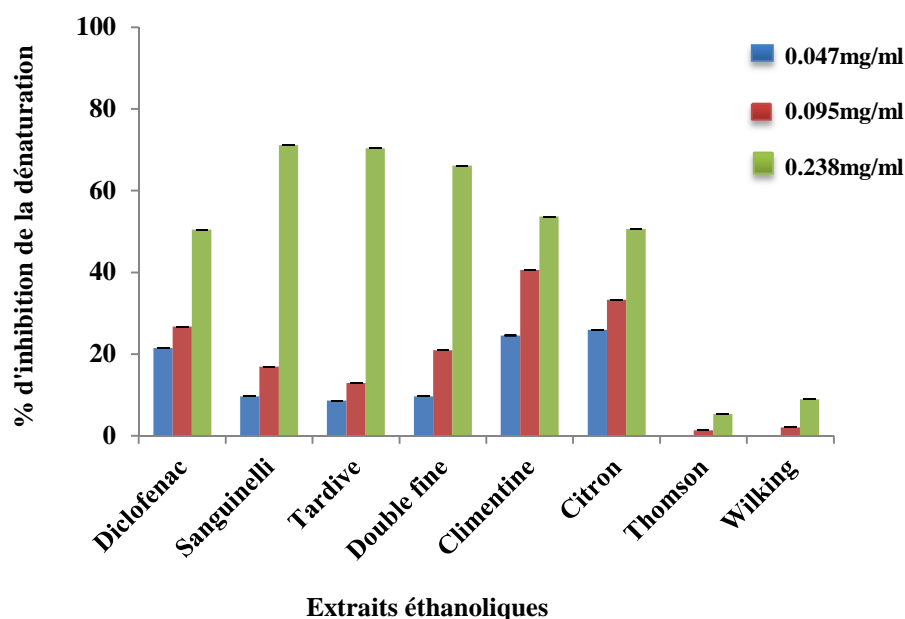


Figure 5: Taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus.

A concentration maximale utilisée de 0.238 mg/ml pour chaque extrait, les taux d'inhibition varient de **5,51 %** pour la variété Thomson à **71.77±0.012%** pour la variété

Sanguinelli. Les autres variétés présentent le taux suivants : $70.37 \pm 0.001\%$ pour la Tardive, $66.12 \pm 0.009\%$ pour la Double fine, $53.71 \pm 0.001\%$ pour la Clémentine et $50.61 \pm 0.001\%$ pour la variété Citron. A la même concentration (0.238mg/ml), Les extraits des variétés Sanguinelli, Tardive, double fine et Clémentine présentent des taux d'inhibitions supérieurs à celui obtenu par le diclofenac de sodium (anti-inflammatoire de référence) (50.43%). Par contre, les variétés Wilking (8.96 ± 0.001) et Thomson (5.51 ± 0.0005) présentent une activité plus faible que le diclofenac vis avis de la dénaturation thermique de l'ovalbumine.

III.3.3-Efficacité des extraits

Pour évaluer l'efficacité inhibitrice des extraits, les IC₅₀ ont été déterminées à partir des représentations graphiques des taux d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Efficacité de l'activité anti-dénaturant de la protéine d'ovalbumine des extraits éthanoliques des feuilles de différents espèces et variétés de Citrus représentée et du diclofenac.

Extrait/ standard	Espèce	Variété	IC 50 en mg/ml
Extrait éthanolique de citrus	<i>C. reticulata</i>	Clémentine	0.191
		Wilking	>>0.283
	<i>C. sinensis</i>	Thomson	>>0.283
		Tardive	0.188
		Sanguinelli	0.181
		Double fine	0.189
	<i>C. limon</i>	Citron	0.231
Diclofenac de sodium	/	/	0.277

A partir du tableau VIII, on constate que les extraits des feuilles des variétés Sanguinelli, Tardive, Double fine et Clémentine présentent une meilleure efficacité anti-dénaturation thermique de l'ovalbumine. que le diclofenac de sodium (0.277mg/ml) Avec des IC₅₀ de 0.181mg/ml, 0.188mg/ml, 0.189mg/ml, et 0.191mg/ml respectivement. Les variétés Wilking et Thomson présentent une efficacité plus faible (>>0.283mg/ml).

III.3.4-Corrélation entre l'effet anti-dénaturant et les teneurs en polyphénols

Les résultats de l'analyse de corrélations linéaires entre l'activité anti-inflammatoire et taux des les phénols totaux des extrait de Citrus (**figure 6**) montrent que les coefficients de corrélation sont de : $R^2=0.845$ pour les polyphenols totaux et $R^2= 0.04$ pour les flavonoïdes.

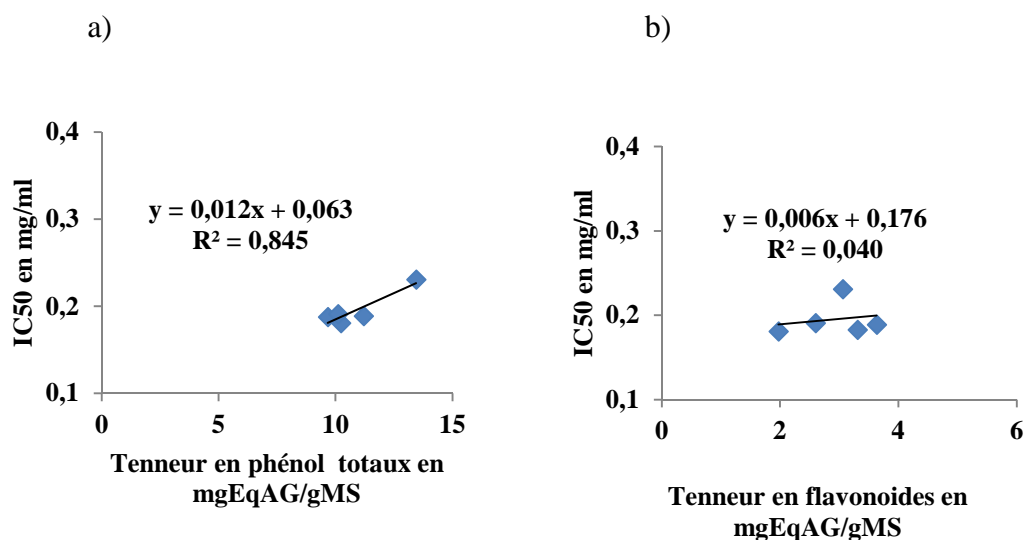


Figure 6: Courbes de corrélation entre l'activité anti-dénaturante et les teneurs en polyphénol.

a) Corrélation entre l'activité anti-dénaturante et les teneurs en phénols totaux. b) Corrélation entre l'activité anti-dénaturante et les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus.

D'après la figure 6 on constate qu'il ya une corrélation linéaire hautement significatif pour les polyphénols ($R^2= 0.845$) et une faible corrélation linéaire pour les flavonoïdes ($R^2= 0.04$).

III.4-EFFET ANTI-HEMOLYTIQUE DES EXTRAITS ETHANOLIQUES DES FEIULLES DE CITRUS

III.4.1-Effet des extraits de citrus sur l'hémolyse induite par tritonX100

III.4.1.1-Effet de tritonX100 et d'éthanol sur l'hémolyse

Selon la figure suivante figure6, on constate que le taux d'hémolyse des globules rouges dépend de la concentration du tritonX100 et de la concentration de l'éthanol présent dans le milieu réactionnel. L'hémolyse des globules rouges augmente en fonction du % de

tritonX100 (**Figure 7a**) sans atteindre une hémolyse totale pour la concentration du triton la plus élevée que nous avons utilisée (1%).

Quant à l'effet de la concentration de l'éthanol, une concentration de 1,5% provoque une légère hémolyse alors que 3% d'éthanol provoque une hémolyse beaucoup importante (**figure 7b**). Pour mener les expériences de l'activité anti-hémolytique des extraits végétaux, nous avons donc choisi de solubiliser nos extraits dans l'éthanol de manière à ce que la concentration finale de ce solvant ne dépasse pas 1,5%.

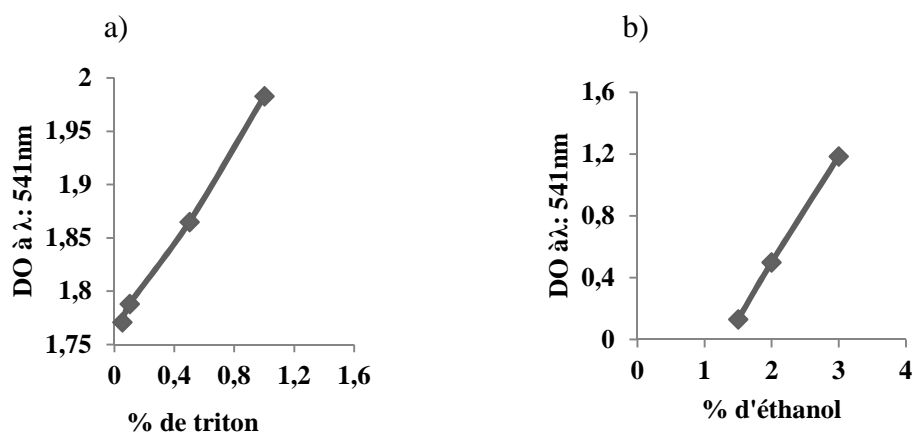


Figure 7: Courbes représentant l'effet de TritonX100 et de l'éthanol sur l'hémolyse des globules rouges.

III.4.1.2-Inhibition de l'hémolyse induite par le triton X100

Les résultats de l'effet des sept extraits éthanoliques des feuilles de Citrus sur l'hémolyse provoquée par le triton à 0,05% sont donnés dans le tableau suivant (**Tableau IX**).

Tableau IX: Effet des extraits des feuilles de Citrus sur l'hémolyse induite par le triton.

Extraits éthanoliques	% d'inhibition d'hémolyse
Clementine	0.17±0.007
Sanguinelli	0.34±0.002
Tardive	0.68±0.001
Wilking	0.433±0.0007
Double fine	1.023±0.002
Thomson	1.035±0.002
Citron	2.815±0.004

D'après ces résultats aucun effet anti-hémolytique significatif n'a été observé quelques soit l'extrait éthanolique testé même à concentration maximale (0.11mg/ml).

III.4.2-Effet des extraits de citrus sur l'hémolyse induite par l'H₂O₂

Les résultats de l'effet des extraits éthanoliques des feuilles de différentes variétés de citrus contre l'hémolyse induite par l'H₂O₂ sont présentés dans la figure 8.

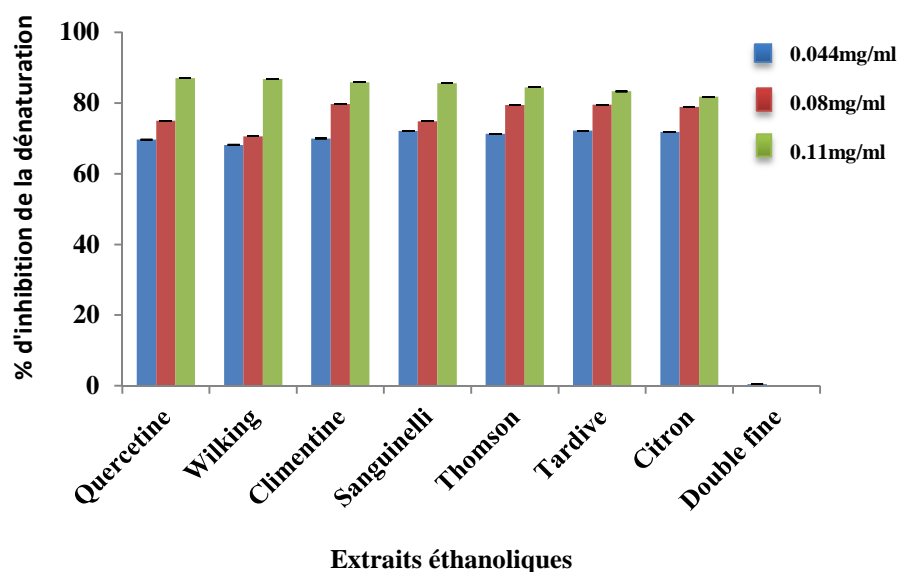


Figure 8 : Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par H₂O₂ à différentes concentrations des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus.

A l'exception de l'extrait de la variété Double fine (taux d'inhibition= $0.44 \pm 0.001\%$ à 0.11mg/ml), les extraits éthanoliques des feuilles des autres variétés testées présentent un effet inhibiteur important contre l'hémolyse provoqué par l'H₂O₂ allant de $81 \pm 0.001\%$ à $87 \pm 0.001\%$ pour la même concentration.

III.4.3-Efficacité des extraits

La concentration entraînant 50% d'effet inhibiteur maximale a été évaluée, les résultats sont présentés dans le tableau suivant (**TableauX**).

Les variétés Wilking, et Clémentine (*C. Reticulata*), variétés Sanguinelli, Thomson et Tardive (*C. Sinensis*) et la variété Citron (*C. Limen*) présentent la même efficacité que la quercétine. Tandis que variété Double fine (*C. Sinensis*) ne présente aucune efficacité contre l'hémolyse induite par l'H₂O₂.

Tableau X: Efficacité anti- anti-hémolytiques des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus exprimées en IC50.

Variété/standart	Espèce	IC50 en mg/ml
Wilking	<i>C. Reticulata</i>	0.028
Clementine		
Sanguinelli	<i>C. Sinensis</i>	>>0.11
Thomson		
Tardive		
Double fine		
Citron	<i>C. Limen</i>	0.028
Quercetine	/	0.028

On comparant à un flavonoïde standard, la quercetine, l'efficacité exprimée en IC50 des différents extraits de Citrus est la même (IC50= 0.028).

III.4.4-Corrélation entre l'activité anti-hémolytique et les teneurs en polyphénols

Les résultats de l'analyse de corrélations linéaires entre l'activité anti-hémolytique et les taux des polyphénols totaux des extraits de Citrus (figure 9).

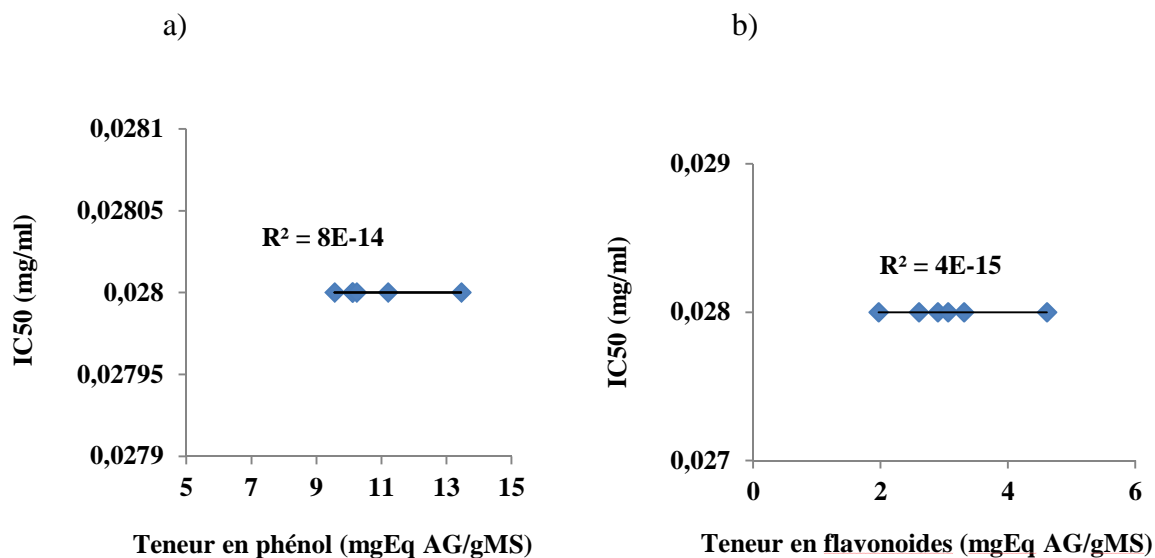


Figure 9 : Correlation entre l'activité anti-hémolytique et les teneurs en phénols totaux (a). L'activité anti-hémolytique et les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus (b).

La figure 9 montrent qu'il y'a pas de corrélation entre l'activité anti-hémolytique et les teneurs en composés phénoliques ($R^2 < 1$).

III.4.5-Corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et l'activité anti-hémolytique

Le résultat de l'analyse corrélatrice entre l'activité anti-inflammatoire et l'activité anti-hémolytique est présenté dans la figure 10.

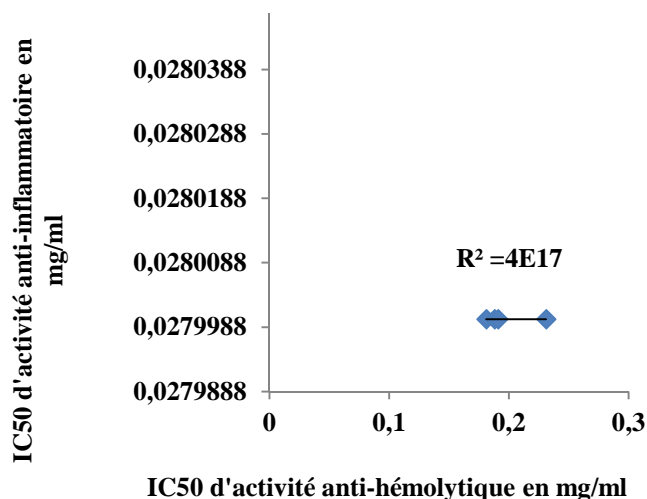


Figure 10: Corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique des extraits des feuilles de Citrus.

La figure 10 montre que le coefficient de corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et l'activité anti-hémolytique est inférieur à 1.

Discussion

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine pour l'être humain, leur importance dans le domaine de santé public est très accentuée dans ces dernières années. Plusieurs molécules bioactifs synthétisées par différentes plantes tels que le citrus sont douées de propriétés biologiques importantes contre divers processus comme l'inflammation. Pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire de substances extraites de plantes, différentes méthodes expérimentales réalisées *in vivo* ou *in vitro* sont mis à notre disposition (**Adarsh Verma et al., 2011**). Notre travail a constitué à évaluer, *in vitro*, l'activité anti-inflammatoire des extraits éthanolique de feuilles de 7 variétés d'agrumes du *Citrus* ; les variétés Thomson, Tardive, Sanguinelli et Double fine de l'espèce *C. sinensis*; les variétés Clémentine et Wilking de l'espèce *C. reticulata* et la variété Citron de l'espèce *C. limon*, en utilisant le test basé sur l'inhibition de dénaturation thermique de l'ovalbumine et les tests basés sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges.

Les extraits des citrus ont fait préalablement objet d'une analyse quantitative des polyphénols. Les résultats de dosage des polyphénols et des flavonoïdes ont montrés qu'en polyphénols totaux, la variété citron est la plus riche alors que la variété Thomson est celle qui présente le plus faible taux. D'autre part, les variétés Sanguinelli et Thomson révèlent respectivement la quantité la plus faible et la quantité la plus élevée en flavonoïdes. Les teneurs en polyphénols qui sont de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de mg en équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche initial varient en fonction de la variété, de l'espèce et de la partie de la plante utilisée. Ainsi, **Li et ses collaborateurs (2006)** en réalisant l'étude analytique sur plusieurs variété de Citrus ont montré des teneurs de 1.2 ± 11.89 mg Eq AG/ g d'écorce sec de Clémentine et 1.61 ± 17.36 mg Eq AG/ g d'écorce sec de *limon*. De même l'étude menée par **Ghasemi et al (2009)** sur l'écorce de 13 variétés de citrus a montré les taux de polyphénols présentent des valeurs variantes de 104.2 ; 161.17 et 172.1 mg Eq AG/ g de matière sèche d'écorce selon la variété de citrus. Des mesures des teneurs en polyphénols des variétés et espèces de Citrus cultivées en Algérie ont été aussi réalisées. L'étude menée par **Dahmoune et al., (2013)** sur *citrus limon* a montré que l'extraits éthanoliques présente une concentration de 12.11 ± 1.2 mgEAG/gMS. **Lagha-Benamrouche et madani (2013)** en analysant les extraits éthanoliques de plusieurs variétés de Citrus algériennes ont trouvé que les taux polyphénols/ flavonoïdes sont de 19.59 ± 0.59 mg EAG/gMS et 2.67 ± 0.05 mgEQ/gMS pour la variété Thomson, 15.89 ± 1.09 mgEAG/gMS et 2.06 ± 0.003 mgEQ/gMS pour la variété Sanguinelli et 13.36 ± 0.89 mg EAG/gMS et 0.36 ± 0.01

mgEQ/gMS pour la variété Double fine respectivement. D'après **Boudries et al., (2015)**, La variabilité des résultats en terme de teneur en polyphénols pour la même variété ou la même espèce pourrait être attribuées essentiellement à la méthode et aux conditions d'extraction, le type de solvant et sa concentration. La diversité structurale des composées phénolique conduit à la variabilité des propriétés physico-chimiques, la différence des standards utilisés, les méthodes de conservation et d'exposition des plantes à la lumière peuvent également affecter la teneur en composées phénoliques (**Li et al., 2009**).

Une fois, les extraits ont été faits l'objet d'une quantification en polyphénols (polyphénols totaux et flavonoides), ils ont été testés pour leurs activités anti-inflammatoires par le test d'inhibition de la dénaturation d'une albumine. On sait que sous l'action d'un stress chimique (acide, base) ou physique (chaleur), les protéines se déplient en une conformation non active par perte de leur structure tertiaire et secondaire suite à la rupture des interaction de stabilisation (électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes, ainsi que les ponts disulfures) (**Benerjee et al., 2011**). Les protéines dénaturées ou présentant un mauvais repliement lors d'un dysfonctionnement de l'organisme, constitue l'une des causes d'induction de la réaction inflammatoire (**Chandra et al., 2012**). Ainsi, dans les maladies auto immunes, tel que les maladies arthritiques, la production des auto-antigènes résultant de la dénaturation des protéines in vivo est un facteur associé à l'installation d'une inflammation chronique au niveau des articulations (**Habibur Rahman et al., 2015**). Des substances douées d'activité de stabilisation thermique des protéines pourront donc présenter un potentiel anti-inflammatoire (**Karthik et al., 2013**).

Dans ce but, la mesure du pouvoir inhibiteur de la dénaturation thermique de protéines a été réalisée pour les extraits éthanoliques des feuilles des différentes variétés de citrus. La protéine model pour ce test est l'albumine sérique humaine. Mais en raison de la non disponibilité en quantité suffisante de cette protéine, nous avons utilisé l'ovalbumine, protéine majoritaire (54%) du blanc d'œuf dotée de valeurs nutritives élevée et d'une grande importance dans les études immunologiques (**Datta et al., 2009**). L'ovalbumine a été extraite et partiellement purifiée à partir du blanc d'œuf de poule frais.

Le suivi de la dénaturation thermique de cette protéine en présence d'extrait de Citrus par turbidimétrie (**Pelletier, 2009**) a montré que les extraits des feuilles des 7 variétés de Citrus testées présentent un pouvoir stabilisateur de l'ovalbumine. Les extraits des variétés

Double fine, Tardive, Sanguinelli et Clémentine présentent une efficacité inhibitrice de la dénaturation thermique ($IC_{50} = 0,190 \pm 0,001 \text{ mg/ml}$) légèrement supérieure à celle du l'anti-inflammatoire de référence, le diclofenac, ($IC_{50} = 0,277 \text{ mg/ml}$). L'extrait du Citron présente une activité inférieure à celle du diclofenac. La stabilisation des protéines par les extraits de Citrus met probablement en jeu des métabolites, polyphénols ou autres, dont l'action stabilisante résulterait de l'établissement d'interactions de types polaires et/ou hydrophobes avec les résidus d'acides aminés de surface de la protéine (**Duganach et ses collaborateurs, 2010**). Par leur effet stabilisateur des protéines, les extraits de citrus présentent donc un potentiel anti-inflammatoire qui reste à confirmer par d'autres tests. Si l'effet anti-inflammatoire de ces extraits venait à être confirmé dans le cas maladies inflammatoires auto-immune, l'inhibition de la formation des auto-antigènes par l'augmentation de stabilisation thermique des conformations natives des protéines pourrait expliquer leur mode d'action.

Les polyphénols sont les substances d'origine végétale doués de diverses propriétés biologiques importantes (**Chatergie et al., 2012**). Pour déterminer si le pouvoir des extraits de citrus à protéger les protéines contre dénaturation thermique est dû à ces métabolites secondaires, une analyse statistique de corrélation linéaire entre l'efficacité anti-dénaturante et les taux de phénols totaux et de flavonoïdes de nos extraits a été établie. Avec les flavonoïdes, aucune corrélation n'a été observée ($R^2 = 0.04$) alors qu'avec polyphénols totaux, une assez bonne corrélation linéaire positive ($R^2 = 0.845$) a été notée. Sachant que notable. L'étude de corrélation, nous permet d'attribuer le rôle de stabilisateur de protéine à des molécules autres que les flavonoïdes, probablement les acides phénoliques ou les tannins qui peuvent agir seuls ou en synergie.

Pour évaluer la capacité qu'ont les extraits des citrus à stabiliser la membrane cytoplasmique, deux tests anti-hémolytiques ont été réalisés : test de l'hémolyse des globules rouges induite par le tritonX100 et test de l'hémolyse des GR induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Le tritonX100 est un détergent non ionique qui possède une partie polaire hydrophile et une queue hydrophobe. Les molécules du tritonX100 s'insèrent dans la bicouche lipidique jusqu'à saturation provoquant ainsi l'extraction des lipides de la bicouche et la perturbation de l'organisation de la membrane qui à concentration en détergeant très élevée sera totalement solubilisée sous forme de micelles ou de liposomes. Les extraits éthanoliques des feuilles des

différentes variétés de citrus utilisés contre l'hémolyse induite par le tritonX100 n'ont montré aucun effet protecteur de la membrane. Le détergeant possède une structure chimique qui le rend plus accessible à la membrane des érythrocytes que les extraits éthanoliques. Et les composés bioactifs extraits des feuilles de variétés Citrus sont probablement incapables d'interagir avec les lipides de la bicouche lipidique. En effet. Dans ce cas la cible des composés bioactifs des plantes sont généralement enfuis à l'intérieur des structures conservés qui sont les micelles et les liposomes (**Preté et al., 2011**).

L'hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène, espèce réactive d'oxygène qui possède une grande capacité à traverser les membranes biologiques (**Reshma et al., 2014**), résulte de la destruction de la membrane suite à la peroxydation lipidique des acides gras insaturés, tels l'acide linoléique et l'acide arachidonique, présents dans ces membranes (**Sumathy et al., 2013**). L'étude de l'activité anti-hémolytique des extraits de Citrus par le test d'inhibition de l'hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène a montré qu'à concentration 0,11 mg/ml, presque tous les extraits de Citrus présentent un effet protecteur de la membrane érythrocytaire avec des taux d'inhibition supérieure à 81.78%. Une exception faite de l'extrait de feuilles de la variété Double Fine. L'efficacité anti-hémolytique comparable à celle de d'un flavonoïde de référence, la quercétine (IC₅₀ = 0,028mg/ml). L'efficacité anti-hémolytique des extraits éthanoliques de Citrus est meilleure que celle de l'extrait d'*Enicostemma axillare* (**Leelaprakash et Dass, 2010**). L'extrait du thé vert présente des pourcentages d'inhibition de 94.96 % ± 0.1 à concentration de 7.5mg/ml, 90.39 % ± 0.2 à une concentration de 37.5mg/ml et 85.42% ± 0.45 à une concentration de 75mg/ml. (**Zabar et ces collaborateurs, 2013**).

L'effet anti-hémolytique peut être attribué à la capacité des métabolites présents dans ces extraits de Citrus à piéger le peroxyde d'hydrogène et à le neutraliser protégeant ainsi la membrane des globules rouges (**James et Alewo, 2014 ; Reshma et al., 2014**). Un autre mécanisme peut expliquer le rôle anti-hémolytique des extraits de Citrus. Le peroxyde d'hydrogène peu réactif peut causer une toxicité par le radical hydroxyle (**James et Alewo, 2014**) ; Selon **Kose et Dogan (1995)**, le peroxyde d'hydrogène peut causer la dégradation de l'hème de l'hémoglobine libérant ainsi les ions Fe²⁺ ce qui génère par la réaction des fentons le radical hydroxyle OH·, plus puissant contribuant ainsi à la peroxydation lipidique. On suppose donc que les extraites éthanoliques contiennent des chélateurs de fer qui inhibe la formation du radical hydroxyle et empêchent ainsi la peroxydation lipidique des membranes. Quelque soit leurs mécanisme d'actions potentiels, ces métabolites actifs qui n'existent pas

dans l'extrait éthanoliques des feuilles de la Double fine ne sont probablement pas des flavonoides ou d'autres polyphénols puisque l'analyse statistique n'a montré aucune corrélation linéaire entre l'activité anti-hémolytique et les teneurs en poly phénols ($R^2 < 1$).

Par leur activité protectrice des membranes, les extraits éthanoliques de Citrus peuvent jouer un rôle important pour limiter la réponse inflammatoire en stabilisant et en protégeant la membrane lysosomale qui présente des caractéristiques de structures identique à celles de la membrane érythrocytaire. La stabilisation de la membrane lysosomale empêchant la libération des constituants des lysosomes des neutrophiles activés tels que les enzymes et les protéases bactéricides, qui causent davantage l'inflammation des tissus (**Sood et Mathur, 2014**).

L'analyse statistique n'a montré aucune corrélation entre l'efficacité anti-dénaturant et l'efficacité anti-hémolytique ($R^2 < 1$). Ce résultat est en faveur d'une implication de processus d'actions à mécanisme différents et indépendants et/ou une implication de molécules différentes.

Une corrélation légèrement positif entre l'activité anti-inflammatoire et l'activité antioxydant ($R^2 = 0.600$); Alors que aucune corrélation linéaire n'a été observé entre l'activité anti-hémolytique et l'activité antioxydant ($R^2 < 1$). On suppose donc que l'efficacité des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus est dépendante/indépendante de la qualité et la quantité en composés phénoliques.

Conclusion

La présente étude avait pour objectif principal l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique des extraits éthanoliques des feuilles de différentes espèces de Citrus. La quantification par méthodes colorimétriques de composés polyphénoliques a montré que les feuilles de Citrus contiennent des teneurs importantes en ces métabolites bioactifs: 9.55 ± 0.09 à 13.45 ± 0.09 mgEAG/gMS en polyphénols totaux et de 1.97 ± 0.48 à 4.61 ± 0.19 mgEQ/gMS en flavonoïdes.

Par leur activité de stabilisation des protéines contre la dénaturation thermique avec une efficacité comparable à celle de l'anti-inflammatoire non stéroïdien le diclofinac ($IC_{50} = 0.277$ mg/ml), d'une part, et par leurs capacité à inhiber l'hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène avec une efficacité comparable à celle d'un flavonoïde de référence la quercetine ($IC_{50} = 0,028$ mg/ml), d'autre part, les composés bioactifs des feuilles de Citrus présenteraient un bon potentiel anti-inflammatoire qui reste à confirmer.

Avec leurs potentiels bioactifs, les feuilles des différentes variétés d'agrumes du genre Citrus cultivés dans les vergers d'agrumes de W. de Bejaia constitueraient une importante source en composés doués de diverses propriétés pharmacologiques ; antioxydants, anti-inflammatoires et anti-hémolytiques, qui justifieraient leur utilisation comme plantes médicinales.

Suite aux résultats obtenus, des investigations mériteraient d'être développées et approfondies en faisant appel à des méthodes d'études de caractérisation qualitatives et quantitatives de ces métabolites bioactifs. Comme, il serait judicieux de confirmer le potentiel anti-inflammatoire par l'utilisation de méthodes biochimiques d'évaluation de l'activité biologique; *in vitro* par test d'inhibition d'enzymes pro-inflammatoires, *ex-vivo* sur model cellulaire ou *in vivo* sur model animal.

Références
Bibliographiques

- **Adrach verma, M., Ajay Kumar, P., Kavitha, D., Aurag, K.B. (2011).** Anti-denaturation and antioxidant activity of *Annon cherimola in vitro*. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 2 (2): 1-6.
- **Akcay, A., Naguyen, Q. et Edelstein, C, L. (2009).** Mediators of inflammation in acute kidney injury., P: 1-12.
- **Anderson, J.N. (2013).** *Modern Bio Series*. West Lafayette, Indiana, p: 39.
- **Barton, G.M. (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 118: 413-420.
- **Benhammou, N., Bekkara, A.F. et Panovska, KT. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activity of the Pistacialentiscus and *Pistacia-atlanticaextracts*. *African Journal of Pharmacy and pharmacology*, 2, 22-28.
- **Bhaskar, V.H., Balakrishnan, N. Analgesic. (2009).** Anti-inflammatory and antipyretic activities of *Pergularia daemia* and *Carissa carandas*. 17 (3): 168-174.
- **Boudries, H., Souagui, S., Nabet, N., Ydjedd, S., Kefalas, P., Madani, K. et Chibane, M. (2015).** Valorisation of Clementine peels for the recovery of minerals and antioxidants: Evaluation and characterisation by LC-DAD-MS of solvent extracts. *International Food Research Journal*, 22(3): 1218-1226.
- **Buchman, T.G. (2002).** The community of the self. *Nature*, 420: 246-251.
- **Charles, N.S, Peter, A.W., Derek, W.G. (2010).** "*Fundamentals of inflammation*". Cambridge university Press, p: 2-3.
- **Chatterjee, P., Chandra, S., Dey, P. et Bhattacharya, S. (2012).** Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative in vitro study. *J. Adv. Pharm. Tech. Res*, 3, 1-3.
- **Courtier, A., Sellam, T. (2015).** Obésité et arthrose, du lien mécanique au lien métabolique. *Obésité*, 10 : 277-282.
- **Crean, D. et Godsan, C. (2015).** Specialised lipid mediators and their targets. *Seminons Immunologie*, 27: 169-176.
- **Dahmoune, F., Boulekbach, L., Moussia, K.,Aoun, O., Lamoureux, M .L. et Hearing, V.G (2003).** Valorisation of *Citrus Limon* residus for the recovery of antioxidant: Evaluation and optimization of microwave (OCA) and ultrasound application to solvent extraction. *Industriel Crop and Products*, 50, 77-87.

- **Danckwardt, S., Hantz, M.W. et Kullozik, A.E. (2013).** Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: Thrombin in hemostasis, cancer and beyond. *J Mol Med*, 91: 1257-1271.
- **Datta, P., Battacharjee, S., Nath, A., Das, R., Batcharjee, C et Datta.; S. (2009).** Separation of ovalbumine from chicken egg white using two-stage ultrafiltration technique separation and purification technology. 66: 353-361.
- **Dejean, C. et Richard, D. (2013).** Mécanisme d'action des glucocorticoides. *Rev Med Int* , 34 : 264-268.
- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. et Vidal, N. (2006).** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts compound. *Food Chemistry*, 97: 654-660.
- **Duaganath, N., Rubesh Kuma, S.R., Kumanan, R. et Jayavveera, N.K. (2010).** Evaluation of anti denaturation property and anti-oxydant activity of traditionally used medicinal plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1 (2): 1-7.
- **Durschmied, D, Suidan, G.L., Demrs, M., Herr, N., Carbo, C., Brill, A., Cifuni, S.M, Nayler, M., Cicko, S., Bader, M., Idzko, M., Bode, C et wagner, D.D.(2013).** Platet serotonin promotes the recrutement of neutrophils to site of acute inflammation in mice, *Blood*, 121(6): 1008-1015.
- **Espinosa, E., Chillet, P. (2010).** "Immunologie". Edition Ellipses. Paris, P : 125.
- **Fina Lovren, Ph.D, Hwee Teoh, Ph.D. et Subodh Verma, M.D, Ph.D, FRCSC. (2015).** Obesity and atherosclerosis: mechanistic insight. *Canadian Journal of Cardiology*, 31:177-183.
- **Garraud, O., Hamzeh-Cognasse, H., Laradi, S., Pozzeto, B. et Cognasse, F. (2015).** Transfusion et inflammation : hier-aujourd'hui-demain. *Transfusion clinique et biologique*, 22 : 168-177.
- **Gasemi, K., Gasemi, Y. et Ebrahimzadeh, M.A. (2009).** Antioxydant activity, phenol and flavonoides content of 13 citrus species peels and tissues. *Pack J pharm Sci*, 22 (3): 277-280.
- **Golias, C.H., Charalabopoulos, A., Stagikas, D. et Batistatou, A. (2007).** The kinin system-bradykinin; biological effect and clinical implication. Multiple role of the kinin system-bradykinin. *Journal of Hippokratia*, 11, 3: 124-128.
- **Govindarjan, R., Vijayakumar, M. et Pushpangadan, P. (2005).** Antioxydant approach to diseases management and the role of Rasayana herbs in obstructive sleep

opea and intermittent hypoxia-Revisited –the bad ugly and good: Implication to the heart and brain. *Sleep Medicine Reviews*, 20: 27-45.

- **Habibur Rahman, M., Eswaraiah, C. et Dutta, A.M. (2015).** *In-vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa*. Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam), *American-Eurasian J. Agric. & Environ*, 15 (1): 115-121.
- **Hebbani, A.V, Reddy, D.V., Nallanchakravarthula. V.(2014).** *In vitro* anti-hemolytic activity of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wt. & Arn. Bark Powder Aqueous Extract *Indian Journal of Advances in Chemical Science* 3(2014) 102-108.
- **James, O. et Alewo, I.M. (2014).** *In vitro* anti-hemolytic activity of *Gymnema sylvester* extracts against hydrogen Peroxide (H₂O₂) induced hémolysis in Human erythrocytes, 2 (7): 1-9.
- **Jouzeau, J.Y., Daouphars, M., Benani, A. et Netter, P. (2004).** Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroenterol Clin Biol*, Paris, 28 : 7-17.
- **Kindt, T. J., Goldsby, R.A. et Osborne, B.A. (2008).** *Immunologie*. 6^{ème} édition, Dunod (Paris), P: 67-68.
- **Kose, K et Dogan,P. (1995).** Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membrane. Protective effect of Ginkgo Biolabo Extract (EGB761). *The Journal of International Medical Rescearch*, 23: 1-8.
- **Kvietys, P.R. et Granger, N. (2012).** Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic boil Med*, 52(3): 556-592.
- **Lagha-Benamrouche, S. et Madani, K. (2013).** Phenolic contents and ontioxydant activity of orange varieties (*Citrus sinensine. L*) cultivated in Algeria: Peel and leaves. *Ind Corp Prod*. 50, 723-730.
- **Larsen, B.H.V, Soelberg, J. et Jager, A.K. (2015).** COX-1 inhibitory effect of medicinal plants of Ghana. *Journal Homepage*, 99: 129-131.
- **Lavie, L. (2009).** Oxidative stress-a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 51: 303-312.
- **Lawrence, T. et Fong, C. (2010).** The resolution of inflammation: anti-inflammatory: roles for NF-κB. *International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 42: 519-523.
- **Lee, B.C. et Lee, J. (2014).** Cellular and molecular player in adipose tissue inflammation in the developpement of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1842 (3): 446-462.

- **Letonturier, P. (2007).** "Immunologie général". 8^{ème} édition, Monlineau cedex, p: 76-79.
- **Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, I.M et Nourshargh, S. (2007).** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immuno reviews*, 7: 678-689.
- **Li, B.B., Smith, B. et Hossan, M. D. M. (2006).** Extraction of polyphenolic from citrus peels. Antioxidant proprieties method, separation and purification technology, 48, 142-460.
- **Madjabda, W., Nartin-Eauclaire, F. M. et Larba-Djebari, F. (2015).** Involvement of kallikrein-kinin System on cardiopulmonary alterations and inflammatory response induced by purified Aah I Toxin from Scorpion Venom. *Inflammation*, 39: 290-302.
- **Markiewski , M. et Lambris, J.D.(2007).** The role of complement in inflammatory diseases from behind the sunenses into the spathight. *The American Journal of Phathology*, 17 (3): 715-727.
- **Martinon, F., Pétrilli,V., Mayor, A., Tardivel, A. et Tschopp, J. (2006).** Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature Publishing Group*, 440, 1-5.
- **Matthew spite, Ph.D. et Charle N Serhan. Ph.D. (2011).** Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ Res*, 107 (10): 170-1184.
- **Merle, N.S., Noe, R., Mecarelli, L.H., Bacchi, V.F.et Roumenina, L.T. (2015).** Complement système part II: role in immunity. *Journal Fronties in Immunologie*, France, 6: 1-26.
- **Mlakar, P., Salobir, B., Cobo, N., Strasek,J., Prezelj, M., Debevc, A., Jug, B., Tercelj, M. Sabovic, M. (2015).** The effect of cardioprotective diet rich with natural antioxidants on chronic inflammation and oxidized LDL during cardiac rehabilitation inpatients after acute myocardial infarction. *IJC Heart and vasculature*, 7: 40-48.
- **Modi, C.M., Mody, S.K., Patel, H.B, Dudhatra, A.K. et Avale, M. (2012).** Toxicopathological ovarview of analgesic and anti-inflammatory drugs in animals. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(1): 149-157.
- **Muster, D. (2005).** Médicaments de l'inflammation. *EMC- Stomatologie*, 1: 21-29.

- **Muthu, S., Durairaj, B. (2015).** Inhibitory effect of hydro ethanolic extracts of *Annona muricata* on human platelet aggregation and hémolysis *in vitro*. *Human Journal*, 2 (4): 207-213.
- **O'Connor, C. et Nichol, A. (2015).** Inflammation, immunity and allergy. *Anesthesia and intensive care medicine*, 16 (7): 328-333.
- **Palgan, A. et Bartuzi, Z. (2015).** Platelet activating factor in allergies., 75: 85-168.
- **Pascier, C. (1995).** Strass oxydatif et inflammation. *Revue Francaise des laboratoires*, 276 : 87-92.
- **Pathak, J.L., Brarenboer, N., Versehuerny, P., Lems, W.F., Luyten, F.P., Klien-Nuclend, J., Bakker, A.D. (2014).** *Esteoparos Int*, 25:2453-2463.
- **Pawelec, J., Goldeck, D. et Tracy, T.K. (2004).** Mechanism of the inflammatory response, 18: 385-405.
- **Pelletier, C. (2009).** Mesure de turbidité. *Technique de l'Ingénieur Mesure et Contrôle*, 2(2355) : 1-19.
- **Petaja, J. (2011).** Inflammation and coagulation. *Journal of Thrombosis Research*. Finland, 2: 34-37.
- **Pillon, F. (2014).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Pratique Pharmacovigilance*, p : 1-4.
- **Preté, PS. C, Domingues, C.C, Meirelles, N.C, Malheiros, SV.P., Goni, F.M., Paula, E. et Schreier, S. (2011).** Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction-Aspin label study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808, 164-170.
- **Quettier-Deleu, C. Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C et Luyckx, M. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hull and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-42.
- **Raymondjean, M. (2007).** Les mécanismes de l'inflammation périphérique. *Revue Francophone des Laboratoires*, n°389, 21-28.
- **Reshma, A., Run, K.P. et Brindsh, P. (2014).** *In vitro* anti-inflammatory, antioxidant and nephroprotective studies on leaves of *Aegle marmelos* and *Ocimum sanctum*. *Assian J Pharm Clin Res*, 7 (4): 121-129.
- **Ribereau-Gayon, P. (1972).** *Propriétés chimiques des phénols*. In "les composés phénoliques des végétaux". Edition Dunod Paris, p : 29-57.
- **Ryan, I. (2013).** Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *Int J Sci*.

- **Sarkhel, S. (2015).** Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria*. *Toxicology Report*, 2: 1-3.
- **Schmaier, A.H. (2016).** The contact activation and kallikrein/kinin system: pathophysiologic and physiologic activities. *Journal of Thrombosis and Homeostasis*, 14: 28-39.
- **Serhan, N.C., Chiang, N. et Dalli, J. (2010).** The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology*, 27: 200-215.
- **Serhan, C.N., Peter A Ward, P.A. et Gilroy, W.D. (2010).** Fundamentals of inflammation. *Cambridge University Press*, p: 2-3.
- **Shaikh, R.U, Pund, M.N. et Gacche, R.N. (2015).** Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. India, p: 1-7.
- **Shmaier, A.M. (2015).** The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14: 28–39.
- **Shrwood, E. et Toliver-Kinsky, T. (2004).** Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 385-405.
- **Silbernagl, S. et Long, F. (2000).** "Atlas des poche de physiopathologie". 1^{ère} édition, France,
- **Sood, N. et Mathur, A. (2014).** Evaluation of pharmacological activities of pectin extracted from apple and Citrus pomace. *An International Quarterly Journal of Biology and Life science*, 2(4):1203-1217.
- **Soro, T.Y., Main, J.C., Coulibaly, S., Nene-Bi, S.A. et Traore, F. (2016).** Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Daniellia oliveri* (Fabaceae). *Original Research Article*, 3(2): 1-9.
- **Sugania, P., Jeyaprakash, K., Mallavarapu, G.R. et Murugun,R. (2015).** Comparaison of the chemical composition, tyrosinase inhibitory and anti-inflammatory activities of the essential oils of *Pagostemo plectranoliodes* from India. *Industrial crops and products*, 69: 300-307.
- **Sumethy, R., Sankaranarayanan, S., Bama ,P., Ranachandran, J., Vijayalakshmi, M. et Deecaraman, M. (2013).** Antioxydant and antihémolytique activity of

flavonoïde extract from fruit peel of *Punica granatum*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(2): 211-214.

- **Voet, D. et Voet, G. (2005).** "Biochimie". 2^{ème} édition, Bruxelles : De Boek, p : 491-3.
- **Wiell, B. et Batteux, F. (2003).** "Immunologie et réactions inflammatoire". 1^{ère} édition. Bruxelles, p : 12-24
- **Yougbaré-Ziébrou, M.N., Ouédraogo, N., Lompo, M., Bationo, H., Yaro, H., Gnoula, C., Sawadogo, W.R. et Guissou, I.p. (2015).** Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis pichon* (Apocynaceae). P : 5-7.
- **Žabar, A., Cvetković, V. Rajković, J., Jović, J., Vasiljević, V. et Mitrović T. (2013).** Larvicidal activity and *in vitro* effects of green tea (*Camellia sinensis L.*) water infusion, 4, 1-4.
- **Zabar, A., Cvetkovic, V., Rajkovic, J., Jovic, J., Vasiljevic, P. et Mitrovic, T. (2013).** Larvicidal activity and *in vitro* effects of green tea (*Camellia sinensis L.*) water infusion. *Biologica Nyssana*, 4(1-2): 75-79.

Annexes

Annexe I :**Réactif et solution pour le dosage des polyphénols et flavonoïdes**

- Folin-ciocalteu à 10% : 10ml du réactif de folin-ciocalteu dans une fiole graduée de 100ml et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.
- Na_2CO_3 à 6% : 6g d' AlCl_3 dans 100ml d'eau distillée.

Courbes d'étalonnages

- **Courbe d'étalonnages pour le dosages des polyphénols totaux (référence l'acide gallique)**

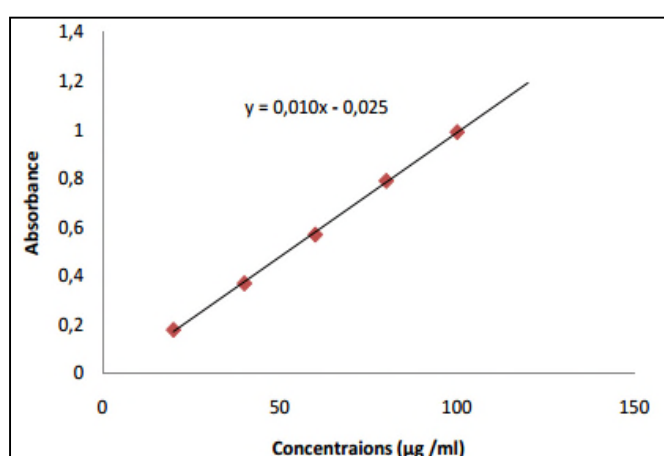


Figure1 : Variation de l'absorbance à 765 nm en fonction de la concentration de l'acide gallique.

- **Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes (référence quercétine)**

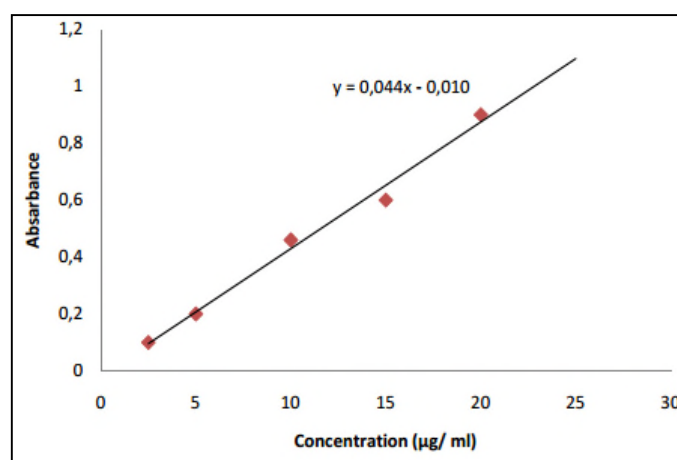


Figure2 : Variation de l'absorbance à 488 nm en fonction de la concentration de la quercétine

Annexe II : Courbes de corrélation

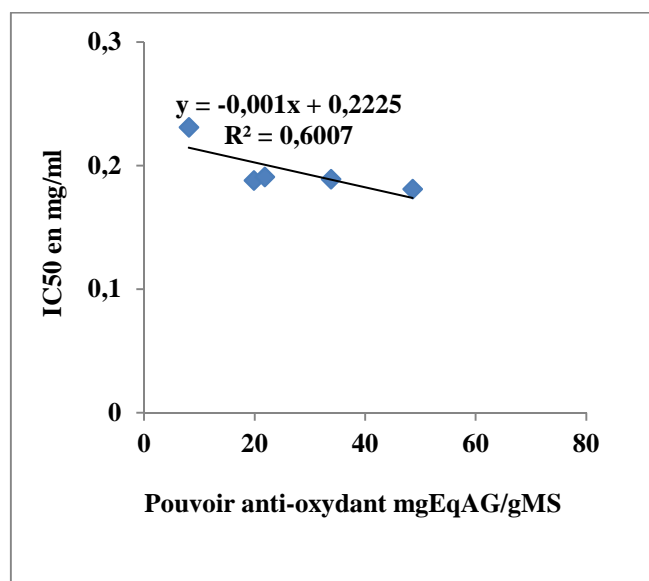


Figure 3 : Courbe de corrélation entre l'activité anti-dénaturante de l'ovalbumine et l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles de Citrus.

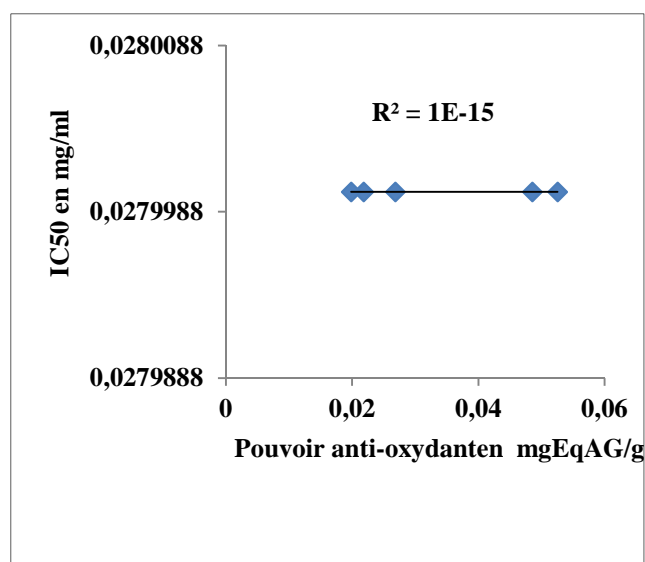


Figure 4 : Corrélation entre l'activité anti-hémolytique et le pouvoir antioxydant des extraits des feuilles de Citrus.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de feuilles de différentes variétés de Citrus par des tests *in vitro*; test d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine et test d'inhibition de l'hémolyse induite par le tritonX100 ou par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les résultats obtenus ont montré que les extraits des variétés Double fin, Tardive, Sanguinelli et Clémentine dont les taux en polyphénols totaux sont de 9.55 ±0.09 à 13.45± 0.09 mgEAG/gMS, présentent une efficacité inhibitrice (IC₅₀= 0,190±0,001mg/ml) légèrement supérieur à celle du diclofenac (IC₅₀= 0,277mg/ml) et un pouvoir anti-hémolyse induite par H₂O₂ comparable à celui de quercitrine (IC₅₀= 0,028mg/ml).

Mots clés : Citrus, polyphenols, activité anti-inflammatoire, thermo-dénaturation, ovalbumine, activité anti-hémolytique.

Abstract

The main objective of the present study is the evaluation of anti-inflammatory activity of the éthanolic extracts of different various of Citrus by *in vitro* tests; test of inhibition of the thermal denaturation of ovalbumin and test of inhibition of the hémolyse induced by the tritonX100 or hydrogen peroxide (H₂O₂). The results obtained showed that extracts of the varieties Double fine, Tardive, Sanguinelli and Clementine whose total polyphenol rates are of 9.55 ±0.09 with 13.45± 0.09 mgEAG/gMS, present an inhibiting effectiveness (IC₅₀= 0,190±0,001mg/ml) slightly higher than that of the diclofenac (IC₅₀= 0,277mg/ml) and an anti-hémolyse capacity induced by H₂O₂ comparable with that of quercitin (IC₅₀= 0,028mg/ml).

Keywords: Citrus, polyphenols, anti-inflammatory activity, thermo-denaturation, egg albumin, anti-hemolytic activity

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم المواد المضادة للالتهاب لمستخلصات ايثانولية من اوراق لانواع مختلفة من الحمضيات بدراسات اجريت مخبريا لمكافحة الافساد الحراري لبروتين الالفالبومين و مكافحة انحلال الدم المحرض بالتريتونX100 او بالبيروكسيد الهيدروجيني.

اظهرت النتائج ان المستخلصات المتنوعة , منها الطارديف, الدويل فين ,السانقوينيلي و الكلبيومين التي تحتوي على معدل يقدر بحوالي 9,55±0,09 الى 13,45±0,09مغ\غ من المادة الجافة. بانها اكثر فعالية من الديكلوفيناك(مغ\مل) 0.277 = (CI50) ونشاط مضاد لانحلال الدم المحرض بالبيروكسيد الهيدروجيني مقارنة بالكيرسيتين(مغ\مل) 0.028 = (CI50)

الكلمات المفتاحية الحمضيات , متعدد الفينول النشاط, المضاد للالتهاب , الافساد الحراري, اوفالبومين, النشاط المضاد لانحلال الدم