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

**UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département des Sciences Biologiques**

**Mémoire**

# MASTER ACADEMIQUE

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière: Biologie**

**Spécialité: Biochimie appliquée**

**Présenté par :**

HAFIANE Hassiba et MAHCENE Salem

# Activité anti-inflammatoire des polysaccharides hydrosolubles issus de quelques plantes spontanées à caractère médicinal sur les neutrophiles humains activés

Soutenu publiquement

**Le : 04/07/2019**

Devant le jury :

| | | | |
|---|---|---|---|
| Président | OULD EL HADJ Mohamed Didi | Pr | Univ. Ouargla |
| Encadreur | BOUAL Zakaria | MCA | Univ. Ouargla |
| Co-Encadreur | BENAOUN Fatima | MCB | Univ. Ouargla |
| Examinateur | TELLI Alia | MCB | Univ. Ouargla |

**Année Universitaire : 2018/2019**

# *Remerciements*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu « le tout Puissant » de nous avoir accordé la force et le courage afin de réaliser ce modeste travail.*

*Nous remercions tous du fond du cœur particulièrement notre encadreur Mr. BOUAL Zakaria, Maître de conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa contribution générale à l'élaboration de ce travail.*

*Nous voudrions remercier M^elle^ BENAOUN Fatima, Maître de conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla pour son aide pour la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury :*

*Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi, Professeur au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, qui nous fait l'honneur de présider ce jury*

*M^elle^ Telli Alia, Maître de conférences au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions le Laboratoire d'analyse médical « IBN ROCHD » Ghardaïa, et en particulier son Directeur, Dr. AMMI SAÏD Mustapha de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.*

*Nous remercions le Laboratoire de Protection des Écosystèmes en Zones Arides et Semi Arides, en particulier son Directeur, Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.*

*Nos remercions s'adressent à : A tous les enseignants du département de biologie faculté des Sciences de Nature et de Vie A tous nos amis surtout les étudiantes de la promotion de 2ème Master Biochimie 2019 de l'Université KASDI MERBAH-OUARGLA.*

*Enfin, nous remercions tous ceux et celles, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Dédicace

*Je dédie ce travail qui grâce à l'aide de Dieu:*

*A mes Chers parents*

*A mon mari*

*A mes frères et sœurs*

*A mon binôme et ami de travail*

*A mes amis*

*A ma famille et ma belle famille*

*Et à tous ceux qui me sont chers*

*Hassiba*

# *Dédicace*

***Avec mes sentiments de gratitudes les plus profonds, Je dédie ce modeste travail :***

***A mes très chers parents, sans eux je n'aurai pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études***

***A mes chères sœurs***

***A mes frères***

***A toute la famille MAHCENE et DEMAIDA***

***A mes Amis***

***A ma future femme***

***A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé par leur soutien moral***

***Salem***

# Liste des abréviations

**A**

AAP **:** *Auricularia auricular-judae* polysaccharide

AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS: Anti-inflammatoires stéroïdiens

ALD : maladies alcooliques du foie

Anv : *Anvillea garcinii*

ANXs: Annexines

Ara : Arabinose

ASP : Polysaccharides d'*Angelica sinensis*

ATPase: Adénosine-TriphosPhatase

**B**

BLyS: B-lymphocyte stimulator

BSPb : Polysaccharidique issue de *Bletilla striata*

**C**

$Ca^{2+}$: Calcium

Cd: Composé

CGD: Chronic Granulomatous Disease

$Cl^{-}$: Chlore

COX: Cyclooxygenases

CR: Complement Receptor

CSH: Cellule souche hématopoïétique

$Cu^{2+}$ : Cuivre

**D**

$D^{\bullet}$: Espèce radicalaire

DAG : Diacylglycérol

DH: Substrats réducteurs

DO : Densité optique

DSS : dextran sulfate sodium

**E**

EPS : Exopolysaccharides

**F**

FAD: Flavin Adenine Dinucleotide

FC : Ferricytochrome C

FcγR: récepteurs des fragments constants des immunoglobulines de type IgG

Fe: Fer fMLP: Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

FNS : Formule numération sanguine

FPR: Formyl peptide receptors

Fuc : Fucose

**G**

Gal : Galactose

GalNAc : N-acétyl galactosamine

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor

Glc : Glucose

GlcNAc : N-acétyl- D-glucosamine

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor

GTP: Guanosine triphosphate

**H**

$H_2O_2$: Peroxyde d'hydrogène

HBs: Antigène de l'hépatite B

$HBSS^1$: Hanks' Balanced Salts sans $Ca^{+2}$ et $Mg^{+2}$

$HBSS^2$ : Hanks' Balanced Salts avec $Ca^{+2}$ et $Mg^{+2}$

HG : homogalacturonane

HOCl: Acide hypochloreux

HPGPC : high-performance gel permeation chromatography

**I**

ICAM: Intercellular Cell Adhesion Molecule

IFN: Interféron

IL: Interleukine

IMPP : Polysaccharide intracellulaires du mycélium de *Pleurotus geesteranus*

**J**

JAM-A: junctional adhesion molecule-A

**L**

LBP : polysaccharide de *Lycium barbarum*

LFA: Lymphocyte Function-associated Antigen

LMAG : Gélose de faible poids moléculaire

LMCH : Chitosan de faible poids moléculaire

LPS: lipopolysaccharideLTB4: leucotriène B4

LXA4: lipoxine A4

**M**

Mac-1: Macrophage-1 Antigen

Man : Mannose

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MPO: myéloperoxydase

MSPS : mycélium sélénium polysaccharides

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**N**

NETs: Neutrophil Extracellular Traps

NOX: NADPH oxydase

NSF: N-ethymaleimide Sensitif Factor

**O**

$O_2^{\cdot -}$ : Anion superoxyde

$OH^{\cdot}$ : Radical hydroxyle

**P**

PAF: Platelet activating factor

PAMPs: pathogen associated molecular patterns

$PBS^1$ : Tampon Phosphate Saline

$PBS^2$ : Tampon Phosphate Sodium

PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

PFPe : fractions de polysaccharidiques de *Passiflora edulis*

PG E2: Prostaglandines E2

PKC : Protéines kinase C

PLCP : polysaccharide isolé de grains de *Plantago asiatica* L.

PLCPUD : polysaccharide isolé de grains de *Plantago asiatica* L traités par une irradiation ultrasons

PLS : polysaccharides sulfatés

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate

PMNs: Polymorphonucléaires neutrophiles

PSGL1: P-selectin Glycoprotein Ligand 1

PSPc : polysaccharide de *Plantago albicans*

PSPn : polysaccharide de *Plantago notata*

**R**

RAGE: Receptor for Advanced Glycation End-products

RG-1 : rhamnogalacturonane-1

Rha : Rhamnose

Rib : Ribose

ROS: Reactive oxygen species

**S**

SDS-PAGE : L'électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium

SFP : fraction soluble de polysaccharides

$S\text{-}Le^x$: Sialyl Lewis X

**T**

TGF-β: Transforming Growth Factor- β

TLR: Toll Like Receptor

TMB : Tétraméthylbenzidine

TNF: Tumor Necrosis Factor

t-SNARE: target SNARE

**V**

VCAM: Vascular Cell adhesion Molecule

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VLA: Very Late Antigen

VRP327A : polysaccharide A

VRP327B : polysaccharide B

v-SNARE: vesicular SNARE

**X**

Xyl : Xylose

# Liste des tableaux


| N° | Titre | Page |
|---|---|---|
| **01** | Constituants majeurs des différents granules des neutrophiles humains | **12** |
| **02** | Réactions contrôlées par la myéloperoxydase | **24** |
| **03** | Effet anti-inflammatoire des polysaccharides naturels | **38** |
| **04** | Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation | **46** |
| **05** | Caractéristiques physicochimiques et méthodes de préparation des solutions de HCl et NaOH | **47** |
| **06** | Origine et type des appareils utilisés au cours de l'expérimentation | **47** |
| **07** | Position systématique et usages thérapeutiques des espèces de plantes spontanées à caractère médicinal choisies dans la région de Ghardaïa | **50** |
| **08** | Méthode de dilution de polysaccharides des plantes (A : PSPn ; B : PSPc) | **51** |
| **09** | Mesure de l'activité de la NADPH oxydase | **54** |
| **10** | Mesure de l'activité de la MPO | **57** |

# Liste des figures


| N° | Titre | Page |
|---|---|---|
| **01** | Neutrophile sous microscope électronique à transmission | **7** |
| **02** | Différenciation des polynucléaires neutrophiles | **8** |
| **03** | Granulopoïèse des neutrophiles | **11** |
| **04** | Processus en cascade menant au recrutement des neutrophiles vers le site inflammatoire | **14** |
| **05** | Molécules d'adhésion et leurs ligands impliqués dans la migration des neutrophiles | **15** |
| **06** | Polarisation orientée du neutrophile | **17** |
| **07** | Étapes de la phagocytose des neutrophiles | **18** |
| **08** | Phagocytose et activation des mécanismes de bactéricide du neutrophile | **19** |
| **09** | Modèle SNARE proposé pour expliquer la libération des granules de neutrophile | **20** |
| **10** | Production de différentes espèces réactives de l'oxygène par le neutrophile | **21** |
| **11** | Activation et assemblage de la NADPH oxydase | **23** |
| **12** | Résolution de l'inflammation par les neutrophiles | **26** |
| **13** | Schéma représente la voie de signalisation induite par le PMA menant à l'activation de la NADPH oxydase | **27** |
| **14** | Schéma représente les principales étapes d'isolement des neutrophiles à partir du sang humain | **52** |
| **15** | Schéma représente les étapes de mesure de l'activité de la NADPH oxydase | **58** |
| **16** | Schéma représente les étapes de mesure de l'activité de la MPO | **59** |
| **17** | Pourcentage d'inhibition de la NADPH oxydase en présence du l'indométacine ou du l'extrait polysaccharidique | **62** |
| **18** | Pourcentage d'inhibition de la MPO en présence du diclofénac ou du l'extrait polysaccharidique | **65** |

# Table de matière


Remerciements I

Dédicaces II

Liste des abréviations IV

Liste des tableaux VII

Liste des figures VIII

Introduction 1

***Chapitre I.- Synthèse bibliographique***

I.1.- Neutrophile et réponse inflammatoire 6

I.1.1.- Inflammation 6

I.1.2.- Polymorphonucléaire neutrophile 6

I.1.2.1.- Généralités 6

I.1.2.2.- Origine et devenir 7

I.1.2.3.- Granulations cytoplasmiques 8

I.1.2.4.- Fonctions des neutrophiles 12

I.1.2.5.- Voie d'activation de neutrophile par le PMA 26

I.1.2.6.- Dysfonctionnement du neutrophile 27

I.1.3.- Les anti-inflammatoires 28

I.1.3.1.- Anti-inflammatoires non stéroïdiens 28

I.1.3.2.- Anti-inflammatoires stéroïdiens 28

I.2.- Polysaccharides à activité anti-inflammatoire 29

I.2.1.- Polysaccharides des végétaux 29

I.2.2.- Polysaccharides des algues 33

I.2.3.- Polysaccharides des champignons 34

I.2.4.- Polysaccharides des animaux 36

***Chapitre II.- Méthodologie de travail***

II.1.- Principe de l'étude 42

II.2.- Matériel de l'étude 43

II.2.1.- Solvants et réactifs 43

II.2.1.1.- Solutions de travail 43

II.2.2.- Matériel biologique 49

II.2.2.1.- Lyophilisats des polysaccharides hydrosolubles 49

II.2.2.2.- Sang humain 49

II.3.- Méthodologie d'étude 51

II.3.1.- Activité anti-inflammatoire 51

II.3.1.1.- Préparation des extraits de polysaccharides 51

II.3.1.2.- Isolement des neutrophiles humains 51

II.3.1.3.-Mesure de l'activité de la NADPH oxydase 53

II.3.1.4.- Mesure de l'activité de la myéloperoxydase 55

***Chapitre III.- Résultats et discussion***

III.1.- Isolement des neutrophiles humains 61

III.2.- Effet des polysaccharides sur l'activité de la NADPH oxydase 61

III.3.- Effet des polysaccharides sur l'activité de la myéloperoxydase 64

Conclusion et perspectives 68

Références bibliographiques 71

Annexes 93

Résumés

# *Introduction*

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique, elle a pour rôle de détecter un agent agresseur, de l'éliminer de l'organisme, et est également indispensable à la réparation d'un tissu endommagé. Sans celle-ci, aucune survie n'est possible (Kirassian, 2015).

L'appel des cellules phagocytaires dans le processus inflammatoire et en réponse à l'infection est un mécanisme de défense essentiel pour éliminer les microorganismes. Les neutrophiles sont un élément clé de cette réponse: ils sont attirés précocement par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse en traversant des capillaires dont la perméabilité s'est accrue ; puis par phagocytose ils éliminent les agents agresseurs. La destruction de l'élément internalisé dans le phagosome dépend alors de l'exécution de deux mécanismes intriqués au sein du neutrophile à savoir la libération d'enzyme protéolytiques et de protides microbicides, ainsi que la production rapide de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette production des ROS qui a lieu au cours du processus appelé explosion oxydative qui implique le fonctionnement de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) oxydase, de la myéloperoxydase (MPO), et de NO synthétase agissant de concert pour éliminer les agents pathogènes (Babior, 1999 ; Babior, 2000 ; Serteyn *et al.*, 2003 ; Belambri, 2013).

Cependant, une production excessive des ROS, au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques endogènes, ainsi qu'une exocytose incontrôlée des granules contenant la MPO peuvent conduire plutôt que réduire l'inflammation, donne lieu au stress oxydant qui conduisant à des maladies inflammatoires chroniques et aiguës sévères, allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement. Ainsi, l'inhibition de la production excessive d'espèces oxydantes et de la dégranulation représente une cible thérapeutique importante et pourrait expliquer en partie les effets bénéfiques de certains produits naturels utilisés contre les troubles inflammatoires (Boukemara, 2016).

Les médicaments chimiques actuellement utilisés pour traiter les maladies inflammatoires modulent et/ou inhibent de nombreuses fonctions des neutrophiles. Pour cela, ces cellules sont considérées comme des cibles importantes pour le développement de nouvelles thérapies. Les anti-inflammatoires classiques non stéroïdiens et stéroïdiens parviennent à atténuer les symptômes de l'inflammation, mais aucun de ces médicaments ne permet la guérison et pourraient même aggraver la progression des dommages. En outre, la plupart de ces anti-inflammatoires ont souvent des effets secondaires néfastes tels que l'hypertension artérielle, la

dérégulation de la synthèse des glucocorticoïdes, l'ostéoporose, les cataractes, la prise du poids et l'insuffisance rénale sévère (Boudoukha, 2018).

Devant l'augmentation considérable du nombre de pathologies inflammatoires et les effets secondaires des anti-inflammatoires synthétiques, de nombreux chercheurs à travers le monde, se sont orientés vers la recherche des composés d'origine végétale qui pourraient traiter les désordres inflammatoire sans effets négatifs. Des études ethnobotaniques et ethno-pharmacologiques ont montrés que les extraits végétaux ont longtemps été utilisés en phytothérapie traditionnelle dans le monde, et particulièrement les extraits enrichis par les polysaccharides qui représentent une classe très intéressante de produits actifs, et sont identifiés comme des composés multifonctionnels, avec plusieurs activités pharmacologiques (Angone *et al*., 2010).

Des plantes médicinales spontanées telles que *Auricularia auricular-judae, Pleurotus geesteranus, Lycium barbarum, Plantago asiatica* et *Caesalpinia ferrea* ayant des activités biologiques représentent un réservoir immense des métabolites primaires notamment les polysaccharides qui possèdent un très large éventail d'activité anti-inflammatoire. Elles sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire des expériences des populations, ainsi que de la médecine traditionnelle (Tian et Wang, 2006 ; Amagase et Farnsworth, 2011 ; Pereira *et al*., 2016 ; Huang *et al*., 2018 ; Meziti, 2018).

La poudre des feuilles et des graines de *Plantago notata et plantago albicans* sont employées comme anti-oxydantes, cicatrisantes, et pour les traitements des inflammations de gorge et des ulcères. En dépit de son utilisation traditionnelle dans diverses conditions inflammatoires, il n'y a aucune étude scientifique sur ses propriétés anti-inflammatoires. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude dont l'objectif essentiel consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits polysaccharidiques issus des plantes utilisées en phytothérapie populaire, *Plantago notata* et *Plantago albicans*. Pour atteindre cet objectif, et en fonction des moyens dont on dispose, l'étude a porté sur:

* La préparation des extraits polysaccharidiques des graines ; et l'isolement des neutrophiles humains.

* L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits par la mesure de l'activité de la NADPH oxydase et de la MPO.

Ce manuscrit est organisé en trois chapitres. Le premier chapitre présente l'essentiel des données bibliographiques en relation avec ce travail. Le second chapitre renferme l'ensemble des

travaux de recherche réalisés. Le troisième chapitre présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion et enfin on termine par une conclusion générale et des perspectives.

# *Chapitre I*

# *Synthèse bibliographique*

## I.1.- Neutrophile et réponse inflammatoire

### I.1.1.- Inflammation

L'inflammation ou réaction inflammatoire est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression qui entraîne une altération tissulaire (Mittal et *al*., 2014). Elle peut être déclenchée par un traumatisme, une brûlure, une irradiation ou par la pénétration d'agents pathogènes extérieurs (Schoroderet, 1992 ; Blétry et *al*., 2006 ; Lakhani et *al*., 2009). Elle a pour objet d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus (Weill *et al*., 2003 ; Winyard *et al*., 2013). L'inflammation de courte durée dite inflammation aiguë est un phénomène bénéfique pour l'organisme qui lui permet de retrouver son intégrité physiologique (Serhan et *al*., 2010 ; Mallem et Gogny, 2014). Elle peut toutefois se pérenniser et devenir chronique, une forme défavorable de la réaction inflammatoire qui nécessite d'être contrôlée par un traitement anti-inflammatoire (Weill *et al*., 2003).

Dans la réaction inflammatoire aiguë, il existe un enchainement complexe d'évènements impliquant l'exsudation, l'activation des cellules endothéliales, l'interaction entre les leucocytes sanguins et l'endothélium vasculaire, le recrutement des leucocytes, l'activation des macrophages du tissu, l'activation des plaquettes et leur agrégation, l'activation du complément, du système de coagulation et la libération des protéases et oxydants par les cellules phagocytaires (Boukemara, 2016). Ce type d'inflammation qui dure de quelques jours à quelques semaines est caractérisé par quatre signes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur, mais peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Botting et Botting, 2000 ; Mathieu et Fonteneau, 2008 ; Richard *et al*., 2012).

### I.1.2.- Polymorphonucléaire neutrophile

#### I.1.2.1.- Généralités

Les polynucléaires neutrophiles, encore appelés leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs), ont été décrits premièrement par Paul Ehrlich la fin du XIXe siècle, lorsque les techniques de fixation et de coloration ont permis d'identifier le noyau lobulé et les granules qui ont donnés leur nom à ces cellules (Amulic *et al*., 2012). Le nom neutrophile se réfère à la coloration par un mélange de base et de l'acide, soit neutre, des colorants. Ils représentent 50% à 70% des globules blancs totaux dans le sang, et sont les plus nombreux dans la circulation sanguine (Borregaard et Cowland, 1997; Amulic *et al*., 2012). Les PMNs sont les cellules immunitaires qui forment la première barrière de défense contre l'introduction des

microbes dans l'organisme. Ils sont un des pivots de l'immunité innée. Ces cellules sont rapidement recrutées vers le foyer infectieux, où ils remplissent leurs fonctions anti-microbiennes (Hurtado-Nedelec *et al*., 2014).

Les PMNs se caractérisent par un noyau multilobé (3 à 5 lobes), leur diamètre est de 10 à 20 µm et ont une demi-vie très brève (6 à 12 heures) dans le sang, elles survivent en moyenne 3 jours après diapédèse dans les tissus. Cependant, lors d'une infection ou d'une inflammation leur durée de vie augmente afin de terminer leur travail (Male *et al*., 2007; Kumar et Sharma, 2010). En l'absence de stimulation, les PMNs subissent une apoptose spontanée par les macrophages (Caruso *et al*., 2012). Le cytoplasme du neutrophile contient un grand nombre de granules dont le contenu est riche en divers substances protéolytiques et microbicides (figure 01). Ainsi, l'activité microbicide et cytotoxique du neutrophile dépend de la libération d'enzymes protéolytiques et la production rapide et massive des ROS qui concourent à la destruction de l'agent pathogène phagocyté (Gougerot-Pocidalo *et al*., 2012).

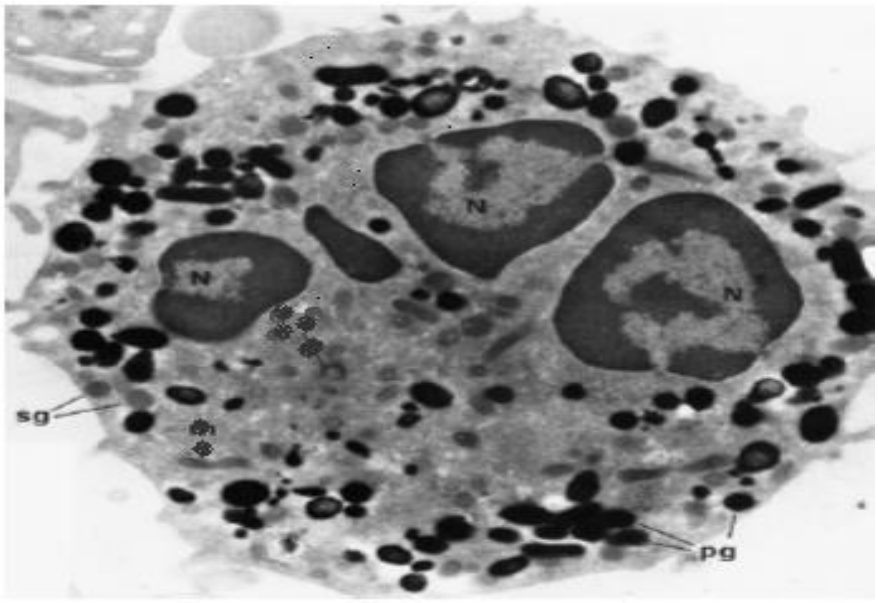


**Figure 01-** Neutrophile sous microscope électronique à transmission (Witko-Sarsat *et al*., 2000)
*granules primaires: pg, granules secondaires: sg, Noyau: N.*

### I.1.2.2.- Origine et devenir

La production des neutrophiles, en quantité, est l'activité principale de la moelle osseuse, où environ les deux tiers de l'activité de formation de cellules sanguines (hématopoïèse) est destinée à la myélopoïèse, le terme utilisé pour la production commune de monocytes et des granulocytes (Borregaard, 2010). Comme toutes les cellules du système immunitaire les PMNs provient d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente (CSH) pourvue d'une forte capacité

d'auto-prolifération et de différenciation. Sous le contrôle de différentes cytokines et selon leur concentrations qui l'entourent, la CSH peut se différencier et devenir une cellule progénitrice myéloïde, menant à la formation des monocytes, des macrophages et des neutrophiles, ou se transformer en cellule lymphoïde, menant à la formation des lymphocytes (Gougerot-Pocidalo *et al*., 2012). La présence combinée de Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), et d'interleukine (IL)-6 favorise la différenciation de la lignée myéloïde jusqu'au progéniteur des granulocytes/macrophages (Hirai *et al*., 2006). Sous l'influence de facteur de différentiation Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), les cellules orientées vers la voie granulocytaire suivent successivement le stade de myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, granulocyte non segmenté (band cell) puis neutrophile mature prêt à passer dans la circulation sanguine et à défendre l'organisme (Dale *et al*., 2008 ; Kantari *et al*., 2008 ; Borregaard, 2010) (figure 02).

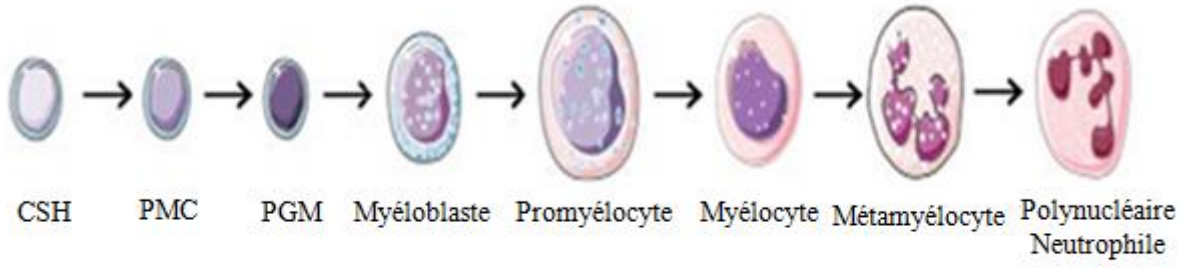


**Figure 02-** Différenciation des polynucléaires neutrophiles (Rosenbauer & Tenen, 2007)

Le processus de maturation et de différenciation des neutrophiles dans la moelle osseuse prend environ 14 jours avec une production quotidienne de $10^8$ à $10^{11}$ neutrophiles. Cette production peut augmenter si des circonstances pathologiques l'exigent, en particulier au cours d'un état infectieux (Seely *et al*., 2003). Dans la circulation, les neutrophiles représentant plus de 90% des phagocytes circulaires, se répartissent en deux secteurs, un secteur circulant accessible à la numération sanguine, et un secteur marginé, adhérant à l'endothélium au niveau des veinules post-capillaires (Seely *et al*., 2003 ; Hurtado-Nedelec *et al*., 2014). Cette marginalisation de neutrophiles permet une mobilisation rapide en réponse à une infection ou un stress (Seely *et al*., 2003).

**I.1.2.3.- Granulations cytoplasmiques**

La plupart des étapes d'activation et d'exécution des fonctions cytotoxiques du neutrophile impliquent la mobilisation des différentes populations de granulations cytoplasmiques (Faurschou et Borreggard, 2003). La fusion des membranes des différents granules par des interactions protéiques avec la membrane du phagosome engendre la libération de leur contenu à l'intérieur du phagosome. La particule ingérée se trouve alors dans un

environnement de haute toxicité qui mène à leur destruction. Les produits de cette digestion ainsi que les hydrolases seront libérées dans le milieu extracellulaire, et serviront à recruter d'autres leucocytes au niveau du foyer inflammatoire (Botting et Botting, 2000 ; Witko-Sarsat *et al.*, 2000 ; Faurschou et Borreggard, 2003). Les différentes granulations du neutrophile constituent un véritable réservoir, non seulement en protéines microbicides, en protéases et en composants du complexe NADPH oxydase qui produit les ROS, mais aussi en divers récepteurs membranaires, molécules d'adhésion, protéines de matrice extracellulaire, ainsi que de médiateurs solubles de l'inflammation (Faurschou et Borreggard, 2003) (Tableau 01).

Les PMNs contiennent quatre types de granules intracellulaires distincts classés en se basant sur la présence de protéines caractéristiques, dont la formation au cours de l'hématopoïèse est séquentielle (figure 03) : les granules azurophiles ou primaires riches en MPO, les granules spécifiques ou secondaires riches en lactoferrine, les granules tertiaires riches en gélatinases et les vésicules sécrétoires riches en albumine (Borregaard et Cowland, 1997 ; Amulic *et al.*, 2012). Cette distinction reflète non seulement des différences dans le contenu des granules, mais aussi des différences dans leur taille, leur morphologie, leur densité et leur profil de mobilisation (Borregaard et Cowland, 1997 ; Gougerot-Pocidalo et Halbwachs-Mecarelli, 2005). Chacun des granules est recruté selon les besoins du neutrophile au cours des différentes étapes de sa migration vers le site inflammatoire (Van Goethem, 2010). De plus, l'empaquetage des protéines dans ces granules ne s'effectue pas au hasard, mais ces granules sont remplis par des protéines synthétisées simultanément (Borregaard, 2010 ; Hurtado-Nedelec *et al.*, 2014). Cette hétérogénéité est accordée aux facteurs de transcription myéloïde, qui régulent l'expression des déférents granules en protéines (Faurschou et Borregaard, 2003).

**I.1.2.3.1.- Granules primaires ou azurophiles**

Les granules primaires (ainsi nommés, granules azurophiles car ils présentent une bonne affinité pour le colorant Azure A) sont les premières granules à apparaître dès le stade précoce de promyélocyte jusqu'au stade de neutrophile mature (Borregaard et Cowland, 1997 ; Segal, 2005). Comportent une large gamme de peptides et de protéines destinés à la destruction et à la digestion des agents phagocytés (Segal, 2005 ; Koenig *et al.*, 2017). Les granules azurophiles sont caractérisés par la présence de la MPO qui est une hémoprotéine microbicide qui utilise le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) comme substrat pour donner naissance à d'autres dérivés pro-oxydants encore plus toxiques (Faurschou et Borregaard, 2003 ; Cowland et Borregaard, 2016). Ces granules peuvent être subdivisés en deux sous-populations : les granules azurophiles précoces, pauvres en défensine, qui apparaissent au début du stade de promyélocytaires et les

tardifs, riches en défensine, qui se forment durant la transition promyélocyte/myélocyte (Faurschou et Borregaard, 2003 ; Häger *et al*., 2010) (figure 03). Les granules azurophiles subissent une exocytose limitée en réponse aux stimulations du neutrophile (Amulic *et al*., 2012 ; Mayadas *et al*., 2014), et il semblerait que ces granules contribuent principalement à la destruction et à la dégradation du microorganisme qui a lieu au niveau du phagolysosome (Mayadas *et al*., 2014).

**I.1.2.3.2.- Granules secondaires ou spécifiques**

Les granules spécifiques constituent, avec les granules à gélatinase, le groupe des granules peroxydase-négatifs (pour l'absence de la MPO), leur formation revient au stade de myélocyte (Faurschou et Borregaard, 2003). Les constituants connus des granules spécifiques incluent plusieurs protéines et peptides antimicrobiens potentiels qui sont libérées dans le milieu extracellulaire plus facilement que les substances d'azurophiles dont la lactoferrine qui fait partie de la famille des transferrines et exerce son pouvoir microbicide envers un large spectre de bactéries à Gram + et – en séquestrant le fer nécessaire à la croissance bactrienne et en se liant aux membranes des cellules bactériennes pour y induire des lésions irréversibles conduisant à la lyse cellulaire (Faurschou et Borregaard, 2003 ; Segal, 2005). Les lysozymes sont aussi des peptides antimicrobiens cationiques qui se trouvent dans les 4 types de granules du PMNs avec une concentration maximale dans les granules spécifiques impliqués dans l'action antimicrobienne (Boxio, 2005), ainsi que les métalloprotéases connues par leurs rôles dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Faurschou et Borregaard, 2003). Les granules spécifiques comportent également des molécules d'adhésion comme les β2-intégrines (CD11b/CD18), des récepteurs pour les chimioattractants comme le récepteur au peptide bactérien formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), le composant membranaire du complexe NADPH oxydase générateur des espèces réactives de l'oxygène lors de la phagocytose (Faurschou et Borreggard, 2003) (figure 03).

**I.1.2.3.3.- Granules tertiaires ou à gélatinase**

Les granules peroxydase-négatifs qui sont dépourvus de lactoferrine et riches en gélatinases constituent la population des granules tertiaires. Ces granules apparaissent au stade métamyélocyte et sont plus petits que les granules spécifiques (Faurschou et Borreggard, 2003) (figure 03). Ils sont considérés comme un réservoir d'enzymes dégradant les éléments de la matrice extracellulaire notamment la gélatinase, le collagénase et la leukolysine (Amulic *et al*., 2012). Comme les granules spécifiques, les gélatinases renferment des récepteurs membranaires facilitant l'extravasion et la migration interstitielle du neutrophile activé comme les β2-intégrines

(CD11b/CD18), des récepteurs pour les chimioattractants comme le formyl peptide receptors (FPR), ainsi que le cytochrome b558 (Borregaard et Cowland, 1997 ; Faurschou et Borreggard, 2003).

### I.1.2.3.4.- Vésicules sécrétoires

Les vésicules sécrétoires sont des vésicules endocytiques constituant un réservoir de récepteurs membranaires nécessaires à l'exécution des fonctions du neutrophile durant les premières phases de la réponse inflammatoire (Witko-Sarsat *et al.*, 2000 ; Faurschou et Borregaard, 2003). Ces vésicules sont les derniers granules à être formés lors de la granulopoïèse, mais les premiers mobilisés lors de l'activation du neutrophile (Faurschou et Borregaard, 2003 ; Häger *et al.*, 2010). La membrane de ces vésicules est riche en β2-intégrine, en Complement Receptor (CR) 1, en récepteurs du fMLP, en récepteurs des lipopolysaccharides (LPS) et en récepteurs des fragments constants des immunoglobulines de type IgG (FcγR) III (Faurschou et Borregaard, 2003), ainsi qu'en leukolysine (Kang *et al.*, 2001) (figure 03).

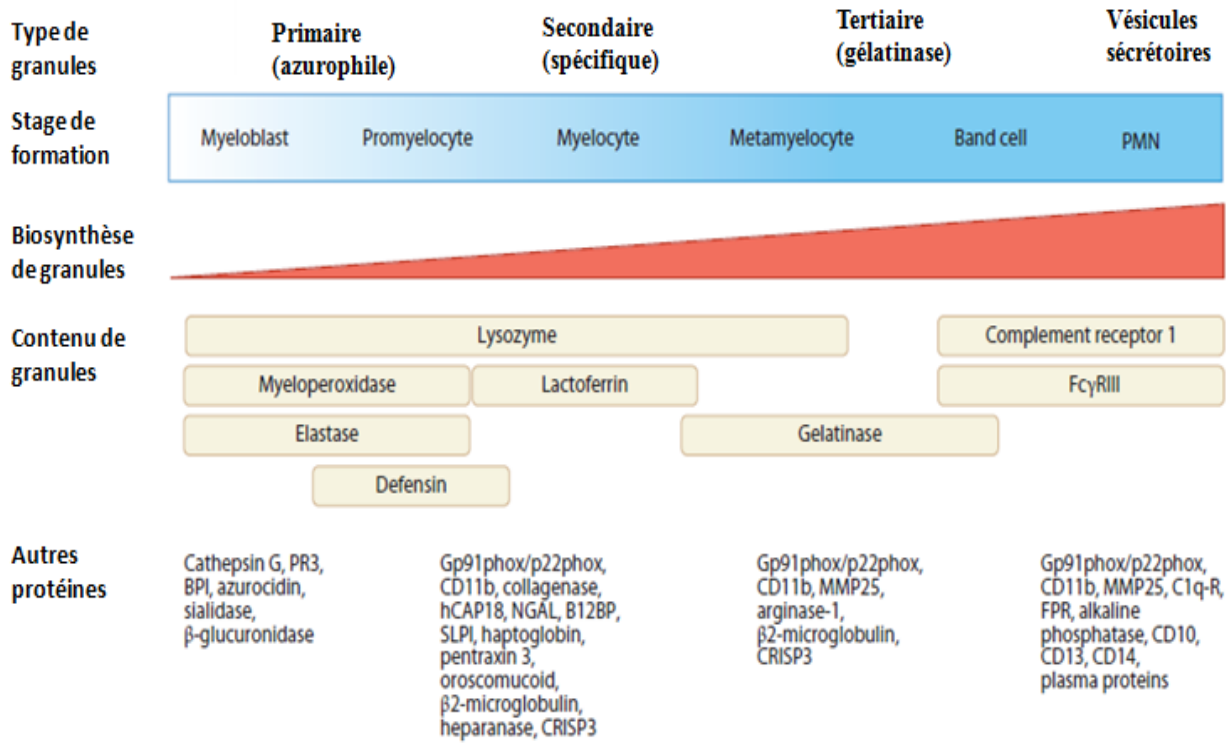


**Figure 03-** Granulopoïèse des neutrophiles (Amulic *et al.*, 2012)

La mobilisation des vésicules de sécrétion est accompagnée par excrétion de L-sélectine de la surface du neutrophile. Les changements de surface combinés induits par l'incorporation de vésicules de sécrétion permettent au neutrophile d'établir un contact ferme avec l'endothélium vasculaire activé (Faurschou et Borregaard, 2003).

**Tableau 01-** Constituants majeurs des différents granules des neutrophiles humains (Faurschou et Borregaard, 2003)

| | Granules azurophiles | Granules spécifiques | Granules à gélatinases | Granules sécrétoires |
|---|---|---|---|---|
| Matrice | Acide mucopolysaccharide<br>α-Mannosidase<br>Azurocidine<br>Bactericidal/ permability increasing protein (BP1)<br>β-glyceroposphatase<br>Cathepsines, Defensines<br>Elastase, Lysosyme<br>Meyéloperoxidase<br>N-acetyl-β-Glucosaminidase<br>Priteinase-3, Sialidase<br>Ubiquitine-protéine | B2-Microglobuline<br>Collagénase<br>CRISP-3(SGP28)<br>Gélatinase<br>hCAP-18 (Human cathelicidin antimicrobial protein)-18<br>Histaminase<br>Heparanase<br>Lactoferrine<br>Lysosyme<br>neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)<br>Urokinase-type plasminogen activator (uPA)<br>Sialidase<br>Transcobalamine-1 | Acetytransférase<br>B2-Microglobuline<br>Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3)<br>Gélatinase<br>Lysosyme | Protéines plasmatiques (y compris l'albumine) |
| Membrane | CD63, CD68<br>Presenilin 1<br>Stomatine | CD11/CD18<br>CD15, CD66, CD67<br>Cytochrome b558<br>Récepteur de l'fMLP<br>Récepteur de fibronectine<br>Sous-unité α de la protéine G<br>Récepeur de laminine<br>Leukolysine<br>L'entigène NB1<br>Protéine de 19 KDa<br>Protéine de 155 KDa<br>RAP1, RAP2<br>SCAMP, SNAP-23,-25<br>Récepteur de thrombospondine<br>Récepteur de TNF, VAMP-2<br>Récepteur de vitronectine | CD11/CD18<br>Cytochrome b558<br>Enzyme de déacetylase<br>Récepteur de l'fMLP<br>Leukolysine<br>NRAMP-1<br>SNAP-23,-25<br>Récepteur de uPA<br>H+-ATPase de type V | Phosphatase alcaline<br>CD11/CD18<br>CD13 CD14 CD16<br>CR1<br>Récepteur C1a<br>Cytochrome b558<br>DAF (Deca-accelerting factor)<br>Leukolysine<br>VAPM-2 |

### I.1.2.4.- Fonctions des neutrophiles

Les PMNs jouent un rôle crucial dans la défense de la première ligne contre les bactéries envahissantes, les champignons et les protozoaires (Faurschou et Borregaard, 2003). Leur rôles est clairement illustré par les infections bactériennes et fongiques récurrentes et mortelles observées lors des conditions de neutropénie ou dans de rares pathologies affectant la structure ou la quantité de protéines des neutrophiles, telle que la granulomatose septique chronique (ou Chronic Granulomatous Disease : CGD), le déficit d'adhésion leucocytaire ou

encore la déficit en granules spécifiques (Häger *et al.*, 2010). La réponse inflammatoire médiée par les neutrophiles peut être considérée comme un processus de plusieurs étapes impliquant l'adhésion initiale des neutrophiles en circulation à l'endothélium vasculaire activé, leur extravasation et migration subséquentes vers les foyers inflammatoires, puis l'élimination ultime *in situ* des microorganismes étrangers par phagocytose. Celle-ci se caractérise par la libération du contenu microbicide des granules cytoplasmiques (dégranulation) et génération des ROS par le complexe NADPH oxydase, un processus appelé explosion oxydative (Faurschou et Borregaard, 2003). En 2004, une autre activité antimicrobienne distincte a été décrite: les PMNs extrudent un réseau de fibres de chromatine entourées des peptides antimicrobiens dérivés de granules et des enzymes telles que l'élastase, la cathepsine G et la MPO. Ces structures, appelées Neutrophil Extracellular Traps (NETs), représentent une stratégie importante pour immobiliser et tuer les microorganismes envahisseurs (Kaplan et Radic, 2012).

#### I.1.2.4.1.- Recrutement et migration vers le foyer inflammatoire

Le processus de recrutement des PMNs circulants vers le site de l'agression comporte une séquence d'évènements où les PMNs sensibilisés passent par les étapes de roulement, arrêt, adhésion ferme et diapédèse, suivis par le chimiotactisme qui assure leur migration vers le foyer inflammatoire en suivant un gradient croissant de chimioattractants (Borregaard, 2010) (Figure 04).

##### I.1.2.4.1.1.- Marginalisation et roulement le long de l'endothélium vasculaire

A l'état physiologique et en absence de l'inflammation, les neutrophiles circulent au centre du flux sanguin et n'interagissent que peu avec l'endothélium vasculaire (Kantari *et al.*, 2008).

Le débit sanguin ralenti suite à la vasodilatation ce qui facilite l'interaction neutrophile-endothélium via les L-sélectines sur les PMNs et les P- et E-sélectines sur les cellules endothéliales. Ainsi, les P-séléctines réagissent avec leurs ligands glucidiques P-selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL1) à la surface du leucocyte pour créer une adhésion faible du neutrophile à la paroi vasculaire (Kelly *et al.*, 2007 ; Borregaard, 2010). Cette interaction étant réversible et transitoire de telle sorte à ce qu'il paraisse entrain de rouler le long de la paroi vasculaire, d'où le nom d'adhésion de roulement (Wagner et Roth, 2000 ; Scher *et al.*, 2010).

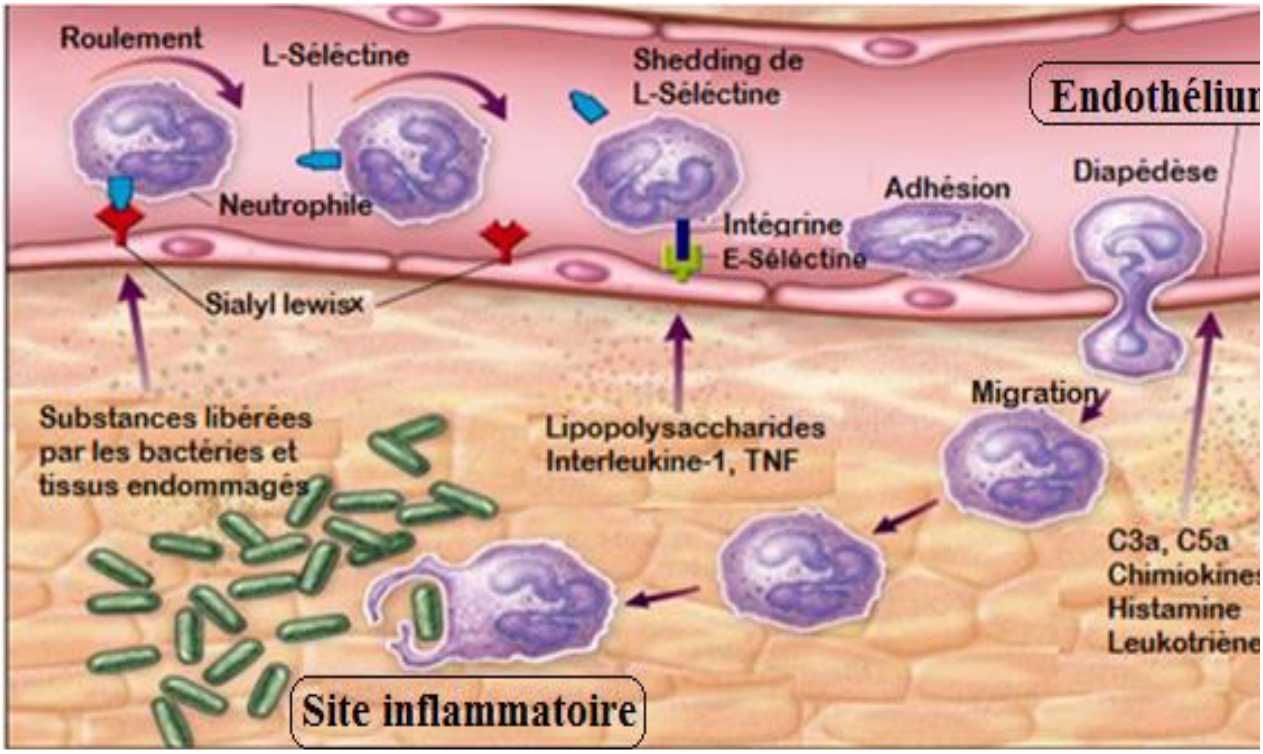


**Figure 04-** Processus en cascade menant au recrutement des neutrophiles vers le site inflammatoire (Karnouf, 2010)

Les sélectines se lient à des structures saccharidiques présentes sur des glycoprotéines, des glycolipides des membranes leucocytaires ou sur l'endothélium vasculaire. Ces ligands appartiennent à la famille des salicylés, fucosylé et accessoirement sulfaté glucosaminoglycanes, appelés Sialyl Lewis X (S-Le$^x$) (Kelly *et al*., 2007). En effet, cette interaction sélectine dépendante avec l'endothélium vasculaire ainsi que des stimuli tels que l'IL-8, le C5a, le leucotriène B4 (LTB4), le Platelet activating factor (PAF) ou encore le fMLP conduisent à la mobilisation des vésicules sécrétoires et l'expression d'un autre type de molécules adhésives qui sont les intégrines qui permettent l'adhésion ferme du neutrophile à la paroi vasculaire (Zarbock et Ley, 2008 ; Choi *et al*., 2009). Cet arrêt du roulement du neutrophile s'effectue grâce à l'interaction des intégrines Very Late Antigen-4 (VLA-4 : α4β1 intégrine), Macrophage-1 Antigen (Mac-1: αMβ2 intégrine) et Lymphocyte Function-associated Antigen 1 (LFA-1: αLβ2 intégrine) avec leurs ligands endothéliaux tels que Intercellular Cell Adhesion Molecule 1 et 2 (ICAM1/ ICAM-2), Vascular Cell adhesion Molecule 1(VCAM-1) ou Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) (Chavakis *et al*., 2003 ; Yonekawa et Harlan., 2005) (figure 05).

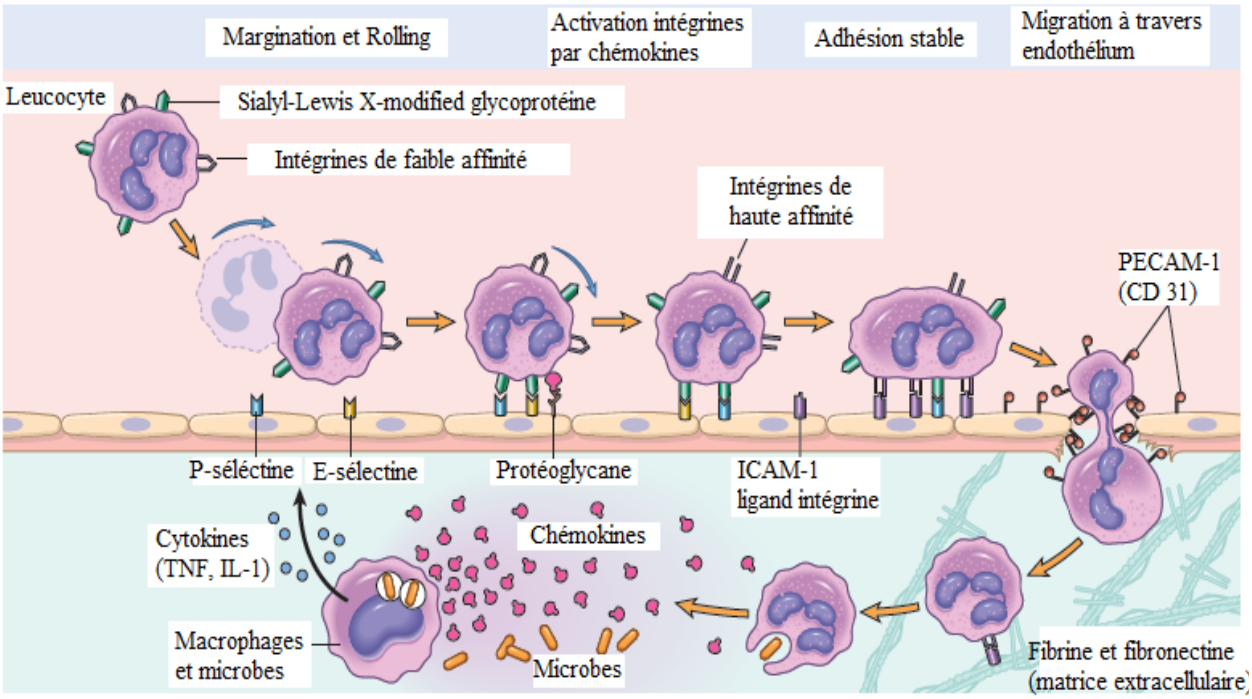


**Figure 05-** Molécules d'adhésion et leurs ligands impliqués dans la migration des neutrophiles (Kumar *et al*., 2014)

### I.1.2.4.1.2.- Migration trans-endothéliale (diapédèse)

Après son adhésion ferme, le neutrophile serait capable de traverser l'endothélium par diapédèse (ou extravasation) par voie para-cellulaire (entre cellules) ou trans-cellulaire (à travers la cellule endothéliale adjacentes) (Carman et Springer, 2004 ; Nourshargh et Marelli-Berg, 2005 ; Borregaard, 2010 ; Kolaczkowska et Kubes, 2013). La transmigration ou diapédèse des neutrophiles s'opère ainsi préférentiellement au niveau des jonctions intercellulaires de l'endothélium vasculaire et fait intervenir au moins deux types de molécules adhésives les Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule1 (PECAM-1: CD31) et les Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) qui entretiennent des interactions homophiliques avec leur homologue à la surface du neutrophile pour l'amener à quitter la lumière vasculaire (Borregaard, 2010 ; Choi *et al*., 2009). Après avoir franchi la paroi endothéliale, le neutrophile doit se frayer un chemin à travers la matrice extracellulaire, une chose pour laquelle il est hautement équipé. En effet, les granules du neutrophile sont chargés en protéases capables de dégrader les collagènes et les laminines de la membrane basale (Ellis et Murphy, 2001 ; Faurschou et Borreggard, 2003 ; Wolf et Friedl, 2011).

**I.1.2.4.1.3.- Migration tissulaire (Chimiotactisme)**

Une fois dans le compartiment interstitiel, les neutrophiles migrent tout au long d'un gradient croissant de chimioattractants vers le site de la lésion ou de l'infection (Baggiolini et Clark-Lewis, 1992 ; Middleton *et al*., 2002 ; Rankin, 2004 ; Borregaard, 2010). La migration se fait par des mouvements amiboïdes du neutrophile qui se déplace selon un gradient de chimioattractants immobilisés, liés aux composants de la matrice extracellulaire (Rankin, 2004).

Un des chimioattractants les plus puissants des neutrophiles est l'IL-8. L'IL-8 est produit par plusieurs types cellulaires comme les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les neutrophiles (Baggiolini et Clark-Lewis, 1992 ; Kobayashi *et al*., 2005). Les bactéries produisent aussi des molécules qui recrutent directement les PMNs comme les peptides N-formylés (Kobayashi *et al*., 2005 ; Choi *et al*., 2009 ; Kolaczkowska et Kubes, 2013).

Le chimiotactisme est un phénomène qui combine deux éléments: la migration cellulaire et la détection de gradient. La migration cellulaire est essentiellement un processus mécanique dans lequel la cellule étend une protrusion à l'avant et rétracte son arrière (Gambardella et Vermeren, 2013). Pour amorcer ce phénomène un agent chimiotactique tels que les composants du complément sécrétés par les cellules immunitaires ou les peptides N-formylés libérés par les bactéries va induire la polarisation initiale (Eddy *et al*., 2000 ; Gambardella et Vermeren, 2013). Apres quelques secondes de l'exposition aux gradients chimioatracttants, la cellule projette dans le sens du gradient de fines extensions cytoplasmiques riche en filaments d'actine organisées en faisceaux, appelées filopodes. Le mouvement des neutrophiles est mieux orienté avec l'augmentation de la concentration des chimioatracttants (Eddy *et al*., 2000) . Les PMNs acquièrent une forme totalement polarisée caractérisée par la présence d'un pseudopode riche en filaments d'actine organisé en réseaux appelé lamellipode au pool intérieur de la cellule et par un uropode en forme de queux au pool postérieur (Eddy *et al*., 2000 ; Pollard *et al*., 2000) (figure 06). Les protrusions de cellule s'attachent et se stabilisent par l'intermédiaire des intégrines pour fournir un moyen physique de traction à la cellule. Cette force de traction est créée par les propriétés contractiles de la myosine II qui forme un réseau d'actinomyosine dans l'uropode de la cellule. La myosine II est ainsi localisée le long des régions latérales du neutrophile polarisé où elle contribue à augmenter la tension contractile et de former une barrière physique qui prévient la formation des pseudopodes latéraux (Eddy *et al*., 2000). A fin que les neutrophiles se déplacent dans le sens du gradient une série de conversions de l'actine G monomérique en actine F "filamenteuse" est impliqué (Samstag *et al*., 2003).

Cette polymérisation génère l'extension du lamellipode. L'avant de la cellule s'attache alors par ses récepteurs membranaires aux surface sous-adjacente. L'uropode s'y détache et se rétracte par la suite. Le corps cellulaire se contracte en fin grâce à la dépolymérisation de l'actine F en actine G et avance dans le sens du gradient chimioattractant (Samstag *et al*., 2003).

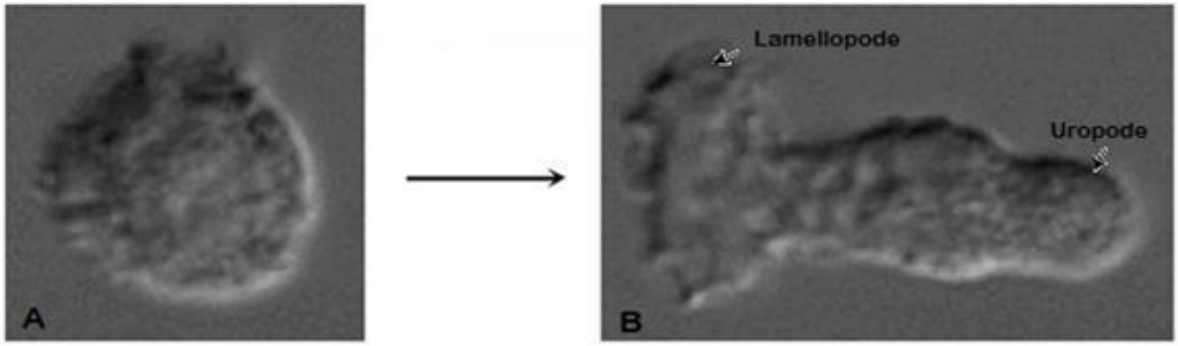


**Figure 06-** Polarisation orientée du neutrophile. En présence de chimioattractant, le neutrophile change de morphologie d'une cellule assez ronde et lisse (**A**) à une cellule polarisée, allongée et plissée et présentant des pseudopodes pointant (**B**) vers les concentrations les plus fortes de chimioattractants (Weiner, 2002)

**I.1.2.4.2.- Phagocytose**

Après avoir arrivé au niveau du site inflammatoire, les PMNs engloutissent et éliminent efficacement les micro-organismes envahisseurs par mécanisme de phagocytose (Kobayashi *et al*., 2005) (figure 07). La première étape de ce processus est la reconnaissance et l'adhérence du neutrophile au pathogène qui implique différents types de récepteurs présents à la surface du neutrophile (Witko-Sarsat *et al*., 2000). Les principaux récepteurs d'opsonines du neutrophile sont les FcγIIRA et les FcγRIIIb qui reconnaitre les fragments constants libres des anticorps fixés au corps étranger et les récepteurs des éléments du complément CR3 qui reconnaitre les particules recouvertes de fragments C3b du complément (Witko-Sarsat *et al*., 2000 ; Sarantis et Grinstein, 2012). Les PMNs expriment également les Toll Like Receptor (TLR) qui peuvent reconnaitre des Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) (Ozinsky *et al.*, 2000 ; Underhill et Ozinsky, 2002 ; Blander *et al*., 2004). L'engagement des TLRs, en particulier TLR2 et 4, active des voies de signalisation qui prolongent la survie cellulaire des neutrophiles (Sabroe *et al.*, 2003). Une fois le contact établi, les récepteurs se regroupent en clusters et déclenchent une signalisation intracellulaire qui implique la voie des tyrosines kinases et des protéines kinases (Greenberg et Grinstein, 2002). L'actine se polymérise et forme des pseudopodes ce qui par conséquence l'invagination de la membrane du neutrophile pour que la particule soit entièrement englobée dans le phagosome (Greenberg et Grinstein, 2002 ; Sarantis et Grinstein,

2012). Cette étape dépend de la taille et de la forme du microbe, ainsi que de l'orientation des particules à sa surface qui pourraient altérer l'efficacité de la phagocytose (Sarantis et Grinstein, 2012).

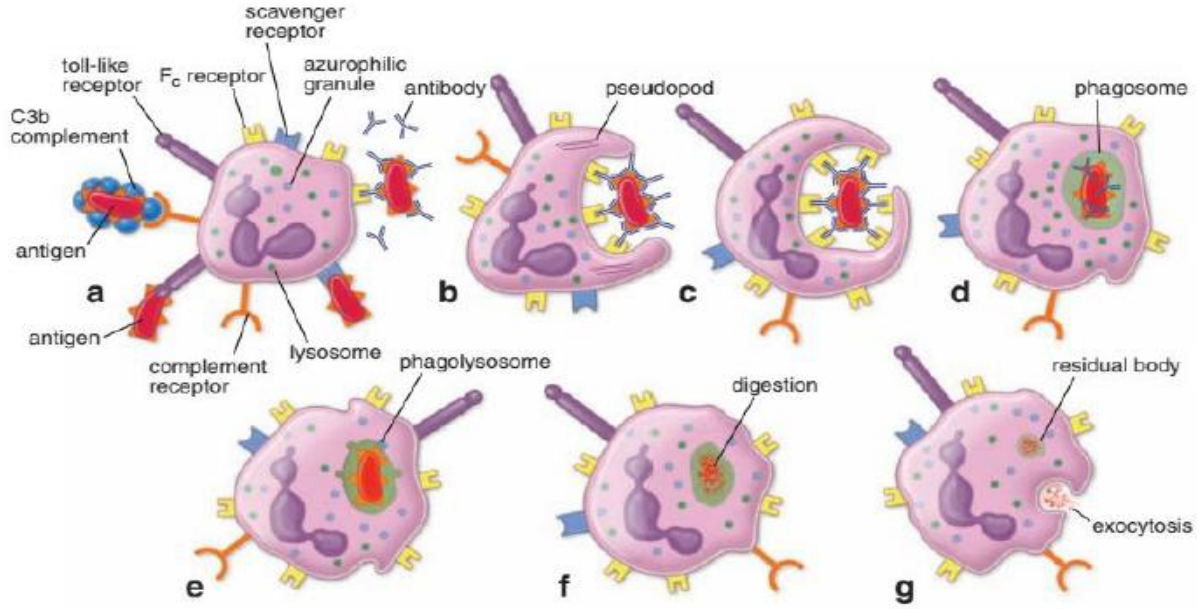


**Figure 07-** Étapes de la phagocytose des neutrophiles. a) La reconnaissance entre l'antigène opsonisé et le récepteur. b) L'engloutissement de l'antigène par les pseudopodes du neutrophile. c) L'internalisation de l'antigène. d) La formation de phagosome. e) La dégranulation et formation de phagolysosome. f) La digestion du microorganisme par le contenu enzymatique des granules. g) Exocytose de la matière digérée dans l'espace extracellulaire (Ross et Pawlina, 2006)

Une fois internalisé, les neutrophiles amorcent divers mécanismes qui vont aboutir à la destruction des particules phagocytées. Pour ce faire, deux mécanismes principales sont utilisés, l'un dépendant et l'autre indépendant de l'oxygène (Gougerot-Pocidalo et Halbwachs-Mecarelli, 2005 ; Scher *et al.*, 2010) (figure 08). Le mécanisme dépendant de l'oxygène repose sur la production rapide des formes réactives de l'oxygène, appelé « explosion oxydative » en utilisant principalement la NADPH oxydase et la MPO (Klebanoff, 2005 ; Kobayashi *et al.*, 2005 ; Nauseef, 2007 ; Kantari *et al.*, 2008). Alors que le mécanisme bactéricide dit « indépendant de l'oxygène » repose sur la libération dans le phagosome du contenu microbicide et protéolytique des granules cytoplasmiques (dégranulation) (Brinkmann et Zychlinsky, 2007 ; Kantari *et al.*, 2008). Outre ces deux mécanismes, les PMNs peuvent utiliser les NETs pour capturer et tuer les microorganismes dans l'espace extracellulaire (Brinkmann et Zychlinsky, 2007 ; Kantari *et al.*, 2008 ; Brinkmann et Zychlinsky, 2012 ; Kaplan et Radic, 2012).

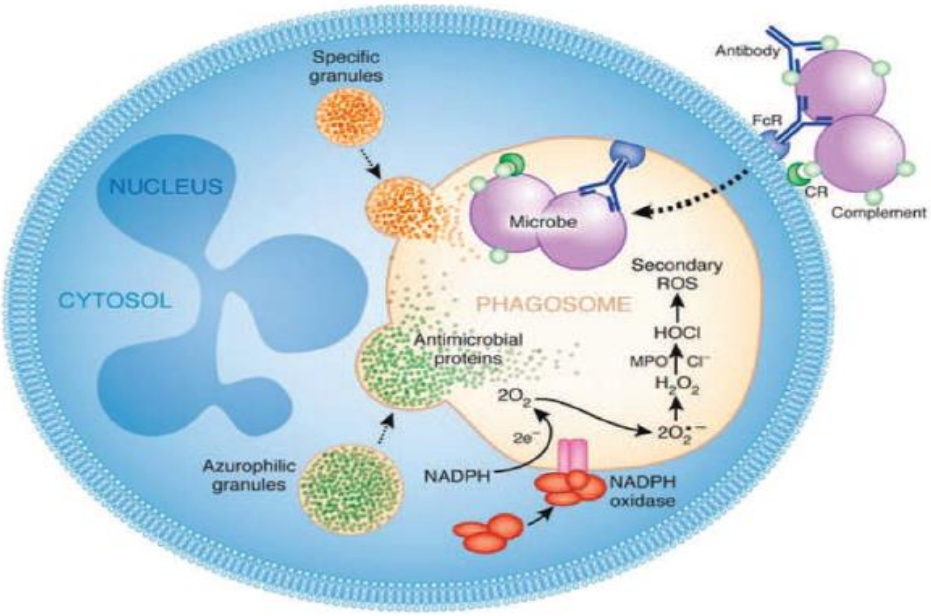


**Figure 08-** Phagocytose et activation des mécanismes de bactéricide du neutrophile (Kennedy et Deleo, 2009)

### I.1.2.4.3.- Dégranulation

Au fur et à mesure que le neutrophile poursuit son activation, les différentes granules sont mobilisés et fusionnent soit avec la membrane plasmique soit avec le phagosome pour déverser leur contenu (Borregaard et Cowland, 1997 ; Nauseef, 2007). A cause de leurs tendances de mobilisation variées, chaque type de granule a été associé à un stade particulier d'activation du neutrophile (Amulic *et al.*, 2012). Cette mobilisation des granules du neutrophile semble s'effectuer d'une manière ordonnée et hiérarchisée avec les vésicules sécrétoires qui présentent la plus grande prédisposition à l'exocytose suivies pas les granules à gélatinases et spécifique puis les granules azurophiles qui sont mobilisés en dernier lieu (Faurschou et Borregaard, 2003).

L'élévation de la concentration du calcium ($Ca^{2+}$) intracellulaire représente le principal stimulant de la mobilisation différentielle des granules du neutrophile (Sengeløv *et al*., 1993). A l'exception des granules sécrétoires, il semble que chaque type de granules est secrété quand un certain nouveau seuil du $Ca^{2+}$ est dépassé (Ligeti et Mócsai, 1999). La dégranulation en réponse au $Ca^{2+}$ semble, par ailleurs, être biphasique: la première phase de haute affinité au $Ca^{2+}$ (faible concentration du $Ca^{2+}$) correspond à l'exocytose des granules spécifiques et à gélatinase, la seconde phase de faible affinité au $Ca^{2+}$ (forte concentration du $Ca^{2+}$) reflète la sécrétion des granules azurophiles (Sengeløv *et al*, 1993 ; Borregaard et Cowland, 1997 ; Rosales, 1997). Cette sensibilité différentielle des diverses populations des granules au $Ca^{2+}$ est attribuée aux variations de régulation des protéines annexines (ANXs) (Ligeti et Mócsai, 1999), un groupe de

protéines comprenant des sites de liaison pour le $Ca^{2+}$ et qui interviennent dans l'agrégation et la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (Borregaard et Cowland, 1997 ; Ligeti et Mócsai, 1999). Il semble que c'est l'hétérogénéité des ANXs qui détecte la différence de sensibilité des granules au $Ca^{2+}$. L'ANX A3 stimule la phase de haute affinité qui correspond plutôt à la sécrétion des granules spécifiques; alors que l'ANX A1 stimule la seconde phase de basse affinité qui correspond aux granules azurophiles (Rosales, 1997 ; Gerke et Moss, 2002). Il est admis que le $Ca^{2+}$ pourrait favoriser la dégranulation du neutrophile en agissant sur les interactions entre les Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachement Protein (SNAPs) et les Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor (SNAREs). Les SNAREs sont des protéines ubiquitaires et hautement conservées constituant une machinerie d'accostage et de fusion de vésicules (Faurschou et Borregaard, 2003). Chaque vésicule de transport exprime sur sa membrane un vésiculaire SNARE (v-SNARE) qui reconnaît et interagit spécifiquement avec un seul type de target SNARE (t-SNARE) présent sur la membrane plasmique (Ligeti et Mócsai, 1999). L'intervention du $Ca^{2+}$ renforce l'interaction v-SNARE-t-SNARE et facilite la fusion des deux membranes. Ensuite, il se produit le recrutement d'une Adénosine-TriphosPhatase (ATPase) cytosolique, N-ethymaleimide Sensitif Factor (NSF) par l'intermédiaire d'une SNAP, ce qui permet l'hydrolyse de l'ATP entraînant la dissociation des SNAREs (Ligeti et Mócsai, 1999 ; Klenchin et Martin, 2000 ; Chen et Scheller, 2001) (figure 09).

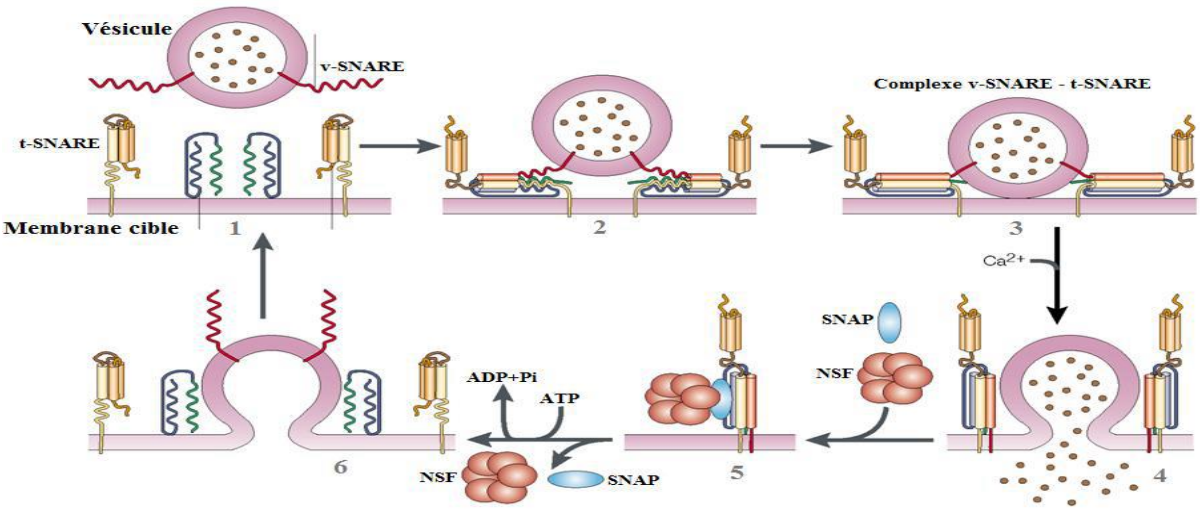


**Figure 09**- Modèle SNARE proposé pour expliquer la libération des granules de neutrophile. (**1**) Le v-SNARE reconnait spécifiquement un t-SNARE présent sur la membrane plasmique. (**2**) L'assemblage des SNAREs permettrait (**3**) l'ancrage de la vésicule à la membrane puis (**4**) la fusion des deux membranes et la libération du contenu granulaire. (**5**) La liaison des SNAP permet la fixation de NSF. (**6**) L'hydrolyse de l'ATP par NSF permettrait la dissociation des SNAREs (Adapté de Chen et Scheller, 2001)

### I.1.2.4.4.- Explosion oxydative

Durant la phase effectrice de la réponse inflammatoire, la production des ROS est indispensable à la destruction de l'élément internalisé dans le phagosome du neutrophile (Groemping et Rittinger, 2005). Cette production accompagnée d'une augmentation de la consommation d'oxygène et du glucose est appelée flambée respiratoire ou explosion oxydative (El Benna *et al*., 2010 ; El Benna *et al*., 2016). L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), l'$H_2O_2$ et l'acide hypochloreux (HOCl) sont les espèces majoritaires produites lors de l'explosion oxydative (Witko-Sarsat *et al*., 2000) (figure 10). La NADPH oxydase, abondante dans les phagocytes et particulièrement les neutrophiles, est l'enzyme essentielle dans la production des ROS. En effet, dès la fusion des granules avec le phagosome naissant, le complexe NADPH oxydase est activé, ce dernier catalyse le transfert des électrons du NADPH cellulaire à l'oxygène moléculaire pour former l'$O_2^{\cdot-}$ (Babior, 2002 ; Klebanoff, 2005), qui donnera ensuite naissance aux autres espèces oxygénées comme l'$H_2O_2$ et l'HOCl (Babior, 2002 ; Groemping et Rittinger, 2005). L'anion $O_2^{\cdot-}$ formé est instable, il est rapidement et spontanément dismuté en $H_2O_2$ sous l'action du superoxyde dismutase (SOD). En présence du chlore ($Cl^-$), le $H_2O_2$ est à son tour transformé en HOCl à pouvoir pro-oxydant encore plus puissant, par la MPO libérée dans le phagosome. Le HOCl peut également donner naissance aux chloramines, à durée de vie longue, qui sont dotés de propriétés cytotoxiques (Hampton *et al*., 1998). En plus de ces produits réactifs, La réaction entre l'$O_2^{\cdot-}$ et le $H_2O_2$ en présence des ions fer ($Fe^{2+}$) ou cuivre ($Cu^{2+}$) génère le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$). Enfin, la réaction entre le HOCl et le $H_2O_2$ peut conduire également à la production de l'oxygène singulet hautement réactif qui peut attaquer les doubles liaisons (Babior, 2002).

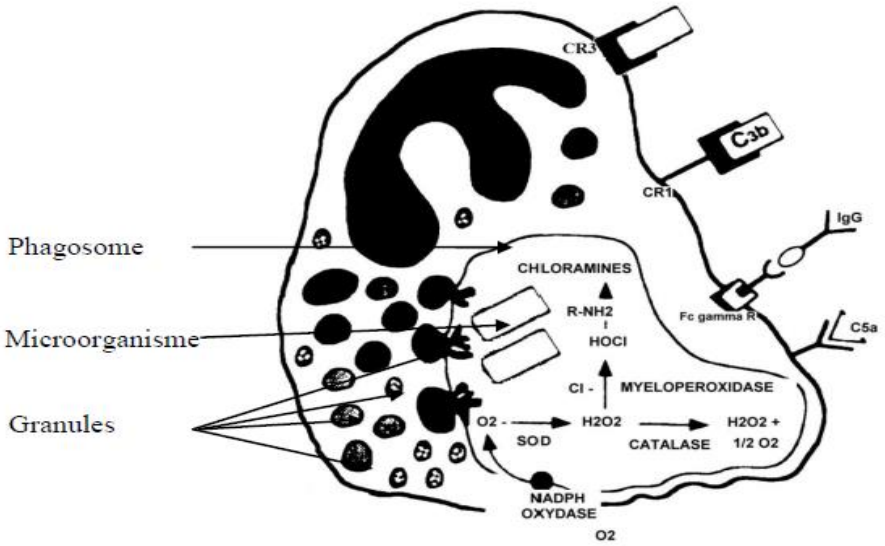


**Figure 10**- Production de différentes espèces réactives de l'oxygène par le neutrophile (Witko-Sarsat *et al*., 2000)

Il est donc évident que cette forte concentration de ces substances pro-oxydantes mène à la destruction des micro-organismes (Babior, 2002). En effet, si ces produits sont libérés de façon exagérée dans le milieu extracellulaire, ils peuvent engendrer des dommages tissulaires et des pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de détresse respiratoire où encore les maladies neurodégénératives (El Benna *et al*., 2010). Au contraire, un défaut dans la fonction du complexe NADPH oxydase est clairement illustré par infections bactériennes et fongiques récurrentes et mortelles observées chez les personnes atteintes de CGD, dues à l'absence de l'activité de NADPH oxydase (Roos *et al.*, 1996 ; El Benna *et al*., 2010).

**I.1.2.4.4.1.- NADPH oxydase**

La NADPH oxydase (NOX, EC 1.6.3.1) est une enzyme multi-protéique qui catalyse la formation de l'$O_2^{\cdot -}$ (Babior, 1999 ; Cross et Segal, 2004 ; Stasia, 2007 ; El Benna *et al*., 2010) selon la réaction suivante :

$$\mathbf{NADPH + 2O_2 \longrightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\cdot -}}$$

Elle est constituée d'un élément membranaire, le cytochrome *b*558 formé de deux sous-unités p22*phox* et gp91 *phox* (*phox* vient de *phagocyte oxidase*, la gp91*phox* est encore appelée Nox2), de protéines cytosoliques p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* et de deux petites protéines G Rac 2 et Rap1A (El Benna *et al*., 2005 ; Bedard et Krause, 2007 ; El Benna *et al*., 2016).

Au repos, les sous-unités de l'oxydase sont dissociées et distribuées entre la membrane plasmique et le cytosol (Groemping et Rittinger, 2005 ; El Benna *et al*., 2009) (Figure 11). Les protéines p40*phox*, p47*phox* et p67*phox* se trouvent dans le cytosol selon un rapport stoechiométrique 1 :1 :1 (Lapouge et *al.*, 2002). Rac2 est également localisée dans le cytosol, liée à un inhibiteur (Rho-GDI) (Kwong et *al.*, 1993 ; Nauseef, 2004 ; Bedard et Krause, 2007). Rap1A est fixée à la membrane avec le cytochrome *b*558 (Quinn et *al.*, 1992 ; Bedard et Krause, 2007). Lors de l'activation du neutrophile par des agents étrangers, des liaisons interprotéiques et protéines-lipides se produisent (Cross et Segal, 2004 ; Selemidis *et al*., 2008). Les sous-unités cytosoliques p47*phox*, p67*phox* et p40*phox* subissent des réactions de phosphorylation et se migrent vers les membranes plasmiques où ils se fixent au cytochrome *b*558 (Raad *et al*., 2009).

La dissociation du Rho-GDI de Rac permettant sa translocation vers la membrane, convertie sous sa forme active, c'est-à-dire liée à une molécule de guanosine-5'-triphosphate (GTP) (Quinn et *al.*, 1993 ; Bokoch et Zhao, 2006). L'assemblage des différentes sous-unités

déclenche l'activité oxydase avec transfert des électrons du NADPH cytosolique vers une molécule d'oxygène via une molécule de Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) et deux groupements héminiques (Doussiere et *al.*, 1996 ; Li et Guillory, 1997 ; Cross et *al.*, 1999 ; Babior, 2004).

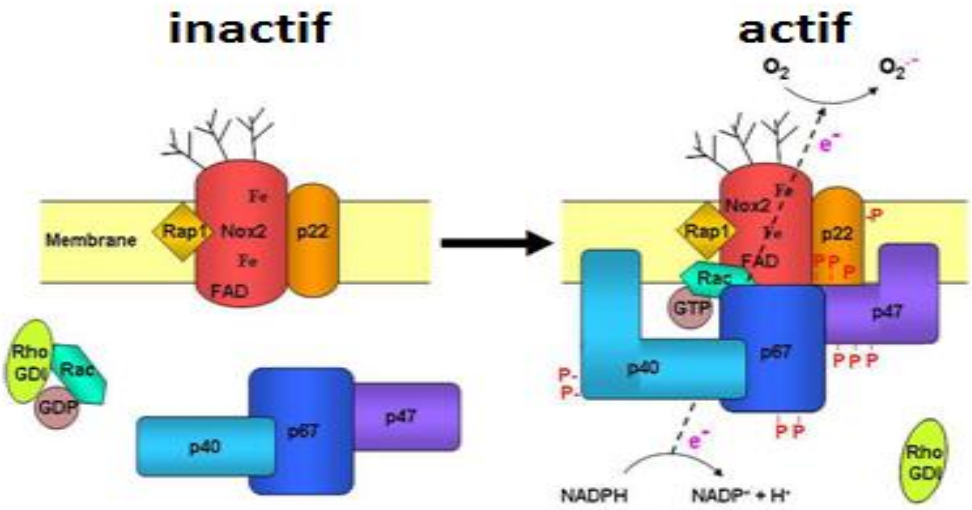


**Figure 11-** Activation et assemblage de la NADPH oxydase (Carrichon, 2009)

**I.1.2.4.4.2.- Myéloperoxydase**

La myéloperoxydase (MPO, EC1.11.2.2) est une enzyme hémique présente en concentrations importantes (2 à 5 % en poids) dans les granules primaires des cellules PMNs et dans une moindre mesure, dans les monocytes (Serteyn *et al*., 2003 ; Ndrepepa, 2019). L'enzyme est un homodimère symétrique, formé de 2 hémi-enzymes, reliées par un pont disulfure (Nauseef *et al*., 2000). Lors de l'activation et de la dégranulation des neutrophiles, la MPO est libérée à la fois dans le phagosome et à l'extérieur de la cellule où elle joue un rôle important dans la dégradation de l'agent pathogène et sert comme un marqueur biochimique pour l'infiltration des neutrophiles dans le foyer inflammatoire (Li *et al*., 2015c ; Galijasevic, 2018). Cependant, les concentrations anormalement élevées en MPO dans le plasma, dans les liquides biologiques et dans les tissus indiquent une activation importante ou excessive des neutrophiles et entrainent des lésions tissulaires et des réactions inflammatoires (Zhang *et al*., 2001 ; Hoy *et al*., 2002 ; Klebanoff, 2005).

La MPO possède une activité de peroxydase et de chloration (tableau 02). Elle utilise l'$H_2O_2$ et catalyse l'oxydation à 2 électrons des ions $Cl^-$ pour former l'HOCl ; elle peut aussi utiliser les ions bromures ou iodures pour former les acides hypohalogénés correspondants (Taurog et Dorris, 1992 ; Serteyn *et al*., 2003 ; Malle *et al*., 2007). Sous sa forme native (MPO-

Fe(III)), elle peut être oxydée en son composé I (Cd I), ce dernier est une MPO qui porte un radical libre sur un acide aminé de la chaîne protéique ce qui lui confère une grande capacité oxydante. Cependant, il réagit avec le $Cl^-$ pour former l'HOCl et ainsi restituer l'enzyme native MPO-Fe(III) (Jungbluth, 2008). Le Cd I peut également réagir avec divers substrats réducteurs (DH) (Serteyn *et al*., 2003 ; Furtmüller *et al*., 2006). Il forme alors une espèce radicalaire $D^\bullet$ et le composé II (Cd II). Ce dernier n'a plus de radical contrairement au Cd I. Le retour à l'état de MPO native se fait alors grâce à l'oxydation d'une nouvelle molécule de DH. Il y a donc production d'une autre molécule $D^\bullet$ rapporte une conversion du composé II en MPO native par l'$O_2^{\bullet-}$ (Serteyn *et al*., 2003 ; Furtmüller *et al*., 2006).

**Tableau 02-** Réactions contrôlées par la myéloperoxydase (Serteyn *et al*., 2003)

| **Activité de chloration** |
|---|
| MPO-Fe(III) + $H_2O_2$ <---> Cd I + $H_2O$ |
| Cd I + $Cl^-$ + H+ ---> MPO-Fe(III) + HOCl |
| Oxydation à deux électrons, quasi-simultanéité des deux étapes réactionnelles |
| **Activité de peroxydase** |
| MPO-Fe(III) + $H_2O_2$ ---> Cd I + $H_2O$ |
| Cd I + DH ---> Cd II + $D^\bullet$ + $H^+$ |
| Cd II + DH ---> MPO-Fe(III) + $D^\bullet$ + $H^+$ |
| Deux étapes d'oxydation à un électron, nécessitant deux molécules de substrat réducteur |

Lors d'une inflammation, La NADPH oxydase est activée très rapidement dans la membrane plasmique et dans les granules spécifiques (Karlsson et Dahlgren, 2002) et produit en milieu légèrement alcalin ou neutre, l'$O_2^{\bullet-}$ d'où dérive l'$H_2O_2$. La fusion des granules spécifiques avec les granules azurophiles contenant la MPO est à l'origine de nouvelles espèces activées, notamment par l'action de la MPO dont l'activité s'intensifie avec l'acidification du milieu. La MPO est active sur une grande variété de microorganismes qu'elle attaque par oxydation en différents points et de différentes manières (virus, bactéries, champignons, protozoaires) (Klebanoff, 1999 ; Babior, 2000). Son activité bactéricide comprend une étape de fixation sur la membrane bactérienne en de nombreux points où existent des structures polysaccharidiques, résistantes aux enzymes protéasiques et hydrolytiques. Cette liaison permet à la MPO une attaque extracellulaire des microorganismes comme les parasites et les champignons trop volumineux pour être phagocytés (Wright et Nelson, 1988).

**I.1.2.4.5.- Production des cytokines et résolution de l'inflammation**

Le PMN participe au développement et à la régulation fine des réponses immunitaires et inflammatoires. Les ROS issue du neutrophile modulent la signalisation intracellulaire, régulant les fonctions des cellules environnantes comme leur apoptose, les réponses prolifératives et la production de médiateurs peptidiques et lipidiques (Kasahara *et al.*, 1997 ; Droge, 2002 ; Maianski *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2010). Les PMNs ont la capacité de synthétiser des cytokines avec des effets pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le Tumor Necrosis Factor (TNF)-α (Hoesel *et al.*, 2005 ; Chakravarti *et al.*, 2007 ; Tecchio *et al.*, 2014). Ces molécules coordonnent potentiellement les fonctions précoces des monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes (Bennouna *et al.*, 2003 ; Nathan, 2006 ; Mantovani *et al.*, 2011). Le TNF-α et l'IL-1 provoquent une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et la production de chimiokines par les cellules endothéliales ce qui favorise l'influx de PMNs en augmentant leur adhésion et en les attirant au site lésé (Dinarello, 1996 ; Driscoll, 2000 ; Slotwinska, 2013). Les PMNs sont également une source de l'IL-8, IL-12, IL-6, IL-3, de GM-CSF, de G-CSF, d'interféron (IFN)-α, et plusieurs d'autres médiateurs (Chakravarti *et al.*, 2007). En effet, le PMN contribue à la prolifération et à la maturation des lymphocytes B en secrétant le B-lymphocyte stimulator (BLyS) (Scapini *et al.*, 2005), ainsi qu'à la différenciation des lymphocytes T et à l'activation des macrophages par sa production d'IFN-γ (Ethuin *et al.*, 2004).

La plupart des réactions inflammatoires s'autolimitent et se résolvent spontanément grâce à un programme interne hautement intégré qui arrête l'inflammation et limite les destructions des tissus de l'hôte (Kantari *et al.*, 2008). En plus de ses fonctions primaires, le neutrophile a aussi la capacité de sécréter une panoplie de médiateurs servant à la résolution de l'inflammation et peut influencer les cellules à proximité du site enflammé et amener d'autres leucocytes à migrer au site (Hoesel *et al.*, 2005 ; Nathan, 2006). L'arrêt du recrutement des neutrophiles au sein du tissu enflammé ainsi que l'élimination des neutrophiles émigrants au niveau du site inflammatoire constituent un des évènements déterminants dans la résolution de l'inflammation (Serhan *et al.*, 2008) (figure 12). Une fois l'agent causal de l'inflammation éliminé, les neutrophiles commutent la biosynthèse de médiateurs lipidiques résolutifs comme l'eicosanoïdes, LTB4, lipoxine A4 (LXA4) et les prostaglandines E2 (PGE2), médiateurs anti-inflammatoires inhibent le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire par inhibition de leur adhésion et leur transmigration à travers l'endothélium vasculaire, tout comme les protéctines D1 et les résolvines E1 médiateurs lipidiques dérivant des acide gras polyinsaturés (ω-3) qui induisent en plus l'apoptose des neutrophiles (Serhan *et al.*, 2008 ; Kantari *et al.*, 2008).

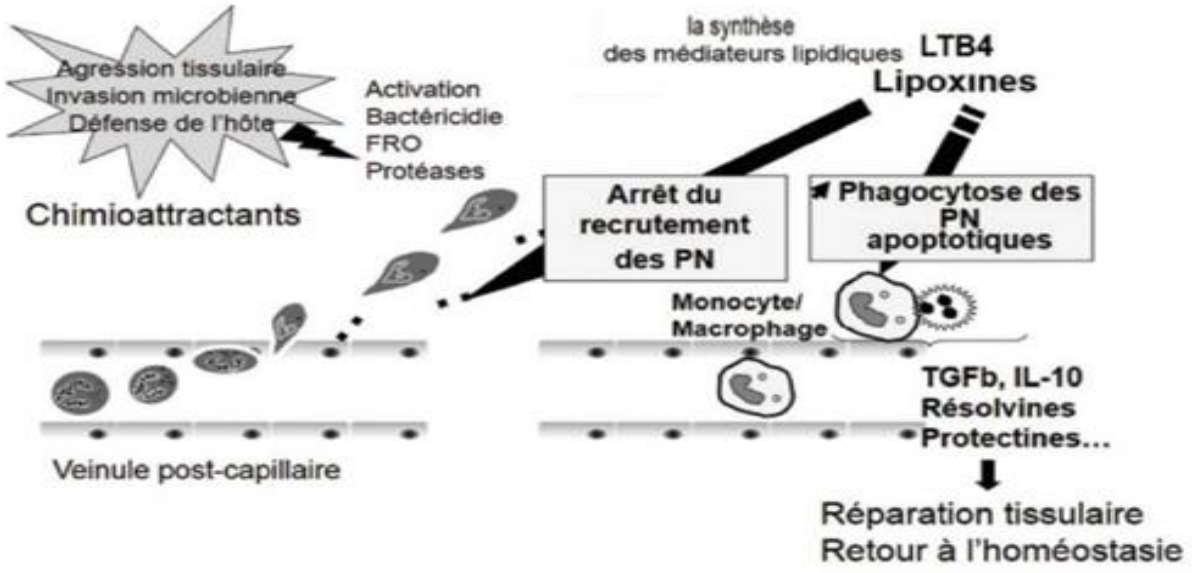


**Figure 12-** Résolution de l'inflammation par les neutrophiles (Serhan, 2010)

Enfin, l'élimination du neutrophile apoptotique est un point critique pour la réussite de la résolution de l'inflammation, leur phagocytose par les macrophages induit la polarisation de ces derniers de la forme pro-inflammatoire (M1) à la forme pro-résolutive (M2) (Fadok *et al*., 1998 ; El Kebir et Filep, 2013). Ces dernières sécrètent des médiateurs comme l'IL-10, l'IL-13 et le Transforming Growth Factor- β (TGF-β) qui induisent l'extinction de l'inflammation et la réparation tissulaire (Kantari *et al*, 2008 ; Ariel et Serhan, 2012 ; Sica et Mantovani, 2012 ; El Kebir et Filep, 2013).

### I.1.2.5.- Voie d'activation du neutrophile par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)

L'activation de la NADPH oxydase peut être induite par une multitude de facteurs solubles ou particulaires tels que les bactéries opsonisées, le zymosan opsonisé, les particules en latex, le fragment du complément C5a, les fMLP, le LTB4, le PAF, le diacylglycérol (DAG), les calcium ionophores (inomycine) ainsi que les activateurs des protéines kinase C (PKC) comme les esters de phorpol tel que le PMA et les acides cis polyinsaturés, comme l'acide arachidonique (El Benna *et al.*, 2005). Ces agents stimulent l'explosion oxydative au sein du neutrophile en activant différentes voies de signalisations dépendantes ou non des récepteurs membranaires. Toutes ces voies de signalisation culminent vers deux évènements importants : la phosphorylation des composants de la NOX2, ainsi que la translocation des sous-unités cytosoliques vers la membrane et l'assemblage complet de la NADPH oxydase (Sheppard *et al*., 2005 ; Boukemara, 2016).

Les enzymes de la famille des PKC jouent un rôle important dans la cascade d'activation de la NADPH oxydase. Les neutrophiles expriment les isotypes α, β et δ qui sont tous capables de phosphoryler p47*phox* et d'induire l'activation de la NADPH oxydase. La stimulation des récepteurs spécifiques mène à la phosphorylation des PKCs qui migrent vers la membrane (Bertram et Ley, 2011). Leur activité nécessite une liaison avec le $Ca^{2+}$ et le DAG, libéré par l'action des phospholipases ou phosphodiestérases (Tauber, 1987 ; Bertram et Ley, 2011). Le PMA n'est pas un activateur physiologique et active directement la PKC qui est un récepteur des esters de phorbol (Cox et *al.*, 1985), il induit une stimulation forte et continue de la sérine/thréonine kinase PKC en biaisant toute la signalisation située en amont dans les conditions normales de stimulation du neutrophile (notamment les phospholipases et la Phosphoinositide 3-kinase) et sans augmentation de la concentration intracellulaire de $Ca^{2+}$ (Carrichon, 2009).

Les PKCs activées par le PMA stimulent les MAPKs (mitogen-activated protein kinases) ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) et p38 (figure 13). La MAPK est une sérine-kinase, effecteur final d'une cascade de signalisation. Les deux isoformes ERK1 (ou p44 MAPK) et ERK2 (ou p42 MAPK) ainsi que la p38 MAPK sont exprimées dans les neutrophiles et impliquées dans la transduction du signal d'activation de l'oxydase et la phosphorylation finale des facteurs cytosoliques (Carrichon, 2009).

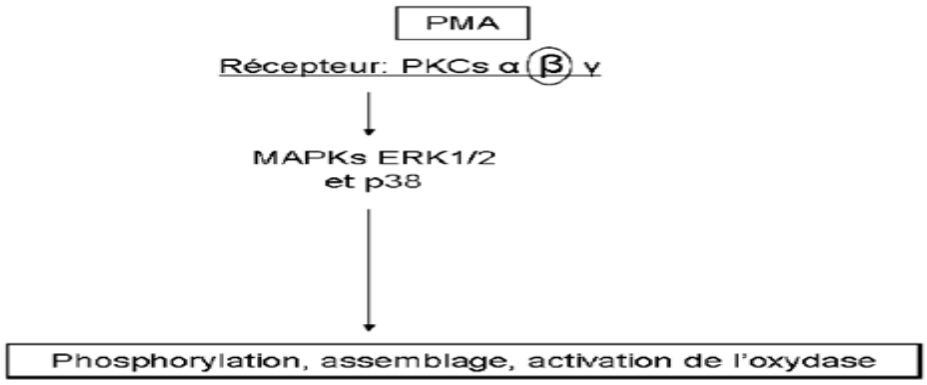


**Figure 13**- Schéma représente la voie de signalisation induite par le PMA menant à l'activation de la NADPH oxydase (Carrichon, 2009)

### I.1.2.5- Dysfonctionnement du neutrophile

Bien que les neutrophiles et leur réponse oxydante soient essentiels à la défense immunitaire innée, des défaillances majeures des fonctions primaires de ces cellules entraînent la plupart du temps des infections répétées et/ou graves, systémiques, parfois mortelles (Smith, 1994). Dans ce cas, ils sont responsables de dommages tissulaires dus à une activation

prolongée, d'une accumulation exagérée et non nécessaire, d'une suractivation ou d'un dérèglement qui implique des pathologies inflammatoires chroniques tel que l'arthrite rhumatoïde, syndrome de détresse respiratoire, l'ischémie, la goutte. Des mécanismes de contrôle rigoureux doivent donc exister au sein de l'organisme pour limiter l'activation des neutrophiles (El Benna *et al*., 2008).

### I.1.3.- Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont classés en deux catégories, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens (Orliaguet *et al*., 2013).

#### I.1.3.1.- Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent d'un point de vue chimique un groupe hétérogène de substances qui agissent sur les produits de la réaction inflammatoire quelle que soit son origine. Se sont des inhibiteurs non sélectifs des cyclooxygenases. Les cyclooxygenases (COX) notamment le COX-1 régulent plusieurs fonctions physiologiques dans l'organisme comme l'intégrité de la muqueuse gastrique, la fonction rénale et l'agrégation plaquettaire (Vonkeman *et al*., 2008). Le fait que, les AINS ciblent les différentes isoformes des cyclooxygénases sans sélectivité, plusieurs effets indésirables vont accompagnés leur usage. Des recherches sont réalisées pour développer des inhibiteurs sélectifs des COX ayant un rôle plus au moins restreins dans la réponse inflammatoire, comme COX-2 (Bressan et Tonussi, 2008 ; Mathews et *al*., 2013 ; Mallem et Gogny, 2014).

#### I.1.3.2.- Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) appelés communément les glucocorticoïdes sont des dérivés de synthèse du cortisol qui agissent à différents niveaux de la réaction inflammatoire. Les corticoïdes agissent sur de nombreux métabolismes et fonctions de l'organisme. Ils augmentent la production de la lipocortine (protéine anti-inflammatoire) inhibant ainsi la phospholipase A2, donc la libération de l'acide arachidonique (Mallem et Gogny, 2014). Par contre, ils diminuent la synthèse des médiateurs de l'inflammation à savoir la bradykinine, la sérotonine, l'histamine, les cytokines et la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation (Kessel et *al*., 2014). L'usage des AIS est associé à de nombreux effets indésirables tels que les troubles gastro-intestinales, l'hypertension artétielle, la dérégulaton de la synthèse des glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003 ; Strehl et *al*., 2011).

## I.2.- Polysaccharides à activité anti-inflammatoire

Les recherches ont révélé que la bioactivitée des polysaccharides étaient étroitement associées aux caractéristiques de la structure, notamment les poids moléculaires, la composition en monosaccharides, les types de liaisons glycosidiques, etc (Jing *et al*., 2015 ; Liu *et al*., 2018). Il est largement reconnu que la composition en monosaccharides est un facteur important lié aux effets anti-inflammatoires des polysaccharides naturels (Song *et al*., 2018).

### I.2.1.- Polysaccharides des végétaux

La baie de Goji, fruit de *Lycium barbarum*, est un aliment tonique traditionnel chinois et exerce des propriétés bénéfiques pour la santé (Amagase et Farnsworth, 2011). L'extrait contenant du polysaccharide de *L. barbarum* (LBP) présente des effets anti-inflammatoires (Kang *et al*., 2017). Les composants chimiques de *L. barbarum* les plus étudiés sont un groupe de glycoconjugués solubles dans l'eau, ils représentent 5 à 8% des fruits séchés. LBP a un poids moléculaire compris entre 8 et 241 kDa. Leur composition structurelle a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE), chromatographie en phase gazeuse, et il s'est avéré que ce sont des glycopeptides complexes constitués d'hétéropolysaccharides d'acides et de polypeptides ou de protéines. LBP contient 6 monosaccharides, contenant principalement de la xylose (Xyl) et du glucose (Glc) avec de plus petites quantités d'arabinose (Ara), de rhamnose (Rha), de mannose (Man) et de galactose (Gal). Les LBP contiennent également de l'acide galacturonique et 18 acides aminés. Ils partagent une structure glycopeptidique Glycan-O-Ser (Tian et Wang, 2006). Les chaînes principales des squelettes glycanniques de LBP se sont révélés être des α- (1,6) - D glucanes ou α - (1,4) - D polygalacturonans (Duan *et al*., 2001). Les polysaccharides LBP sulfatés ont montré une efficacité plus grande sur les immunisations améliorées (Amagase et Farnsworth, 2011). Le traitement par dextran sulfate sodium (DSS) a induit une infiltration étendue et sévère des neutrophiles dans le tissu colique. La supplémentation en baies de Goji a permis de limiter l'infiltration de neutrophiles dans la muqueuse colique chez les souris traitées au DSS, tandis qu'aucune infiltration de neutrophiles n'a été observée chez les souris sans traitement par le DSS, quel que soit le traitement par le baies de Goji. En conséquence, l'inhibition de l'infiltration des neutrophiles confère des effets protecteurs à l'intestin (Kang *et al*., 2017).

Les graines de *Plantago asiatica* L. sont utilisées depuis longtemps dans la médecine traditionnelle, les aliments fonctionnels et les suppléments diététiques en Chine et dans d'autres pays asiatiques (Huang *et al*., 2018). Le poids moléculaire de polysaccharide brut isolé de grains de *Plantago asiatica* L. (PLP) a été déterminé par high-performance gel permeation chromatography (HPGPC) comme étant d'environ 1894 kDa. La PLP contient 29,2 g de $kg^{-1}$ de

protéine et 145,8 g de $kg^{-1}$ d'acide uronique (Yin *et al*., 2010). Les polysaccharides traités par une irradiation ultrasons à partir des graines de *Plantago asiatica* L (PLCPUD) présentaient une activité anti-inflammatoire intestinale plus forte par rapport aux polysaccharides naturels (PLCP). Les PLCPUD ont un poids moléculaire inférieur et une viscosité apparente réduite par rapport aux polysaccharides naturels, aussi, la structure avant et après le traitement par ultrasons ne modifiait pas la structure principale des polysaccharides dans les conditions du test. Les PLCPUD ont eu un effet anti-inflammatoire intestinal marqué dans la colite induite par le DSS chez la souris, ce qui pourrait être lié à l'inhibition de l'infiltration des neutrophiles dans le côlon enflammé. Dans une étude, l'activité de la MPO était significativement plus élevée dans les souris nourries au DSS (1,198 ± 0,118U/mg de tissu humide) que dans le groupe témoin (absence de DSS) (0,165 ± 0,05 U/mg de tissu humide), ce qui signifier la participation des neutrophiles dans le processus inflammatoire. Comparativement au groupe traité par DSS, l'activité MPO du tissu du côlon des groupes traités par DSS + PLCP et du groupe traité par DSS + PLCPUD (respectivement 0,602 ± 0,129 et 0,693 ± 0,152U/mg de tissu humide) était significativement plus basse. La réduction de l'activité de la MPO peut être interprétée comme une manifestation de l'effet anti-inflammatoire de PLCP et de PLCPUD (Huang *et al*., 2018).

*Passiflora edulis*, communément appelée «Maracujá», fait partie de la famille des Passifloraceae, originaire des régions tropicales et subtropicales des Amériques et largement répandue dans le nord et le nord-est du Brésil (Montanher *et al*., 2007). En médecine populaire, *P. edulis* a une application importante est son utilisation comme cataplasme ou lotion pour le traitement des infections et des inflammations dermiques (Silva *et al*., 2015). Des études ont rapporté diverses activités pharmacologiques d'extraits, de pulpes de fruits et de fractions polysaccharidiques de *P. edulis* (PFPe), notamment la prévention des processus inflammatoires dans le côlon (Cazarin *et al*., 2014). PFPe possède des structures linéaires homogalacturonane (HG) et rhamnogalacturonane-1 (RG-1) ramifiées en sucre neutre. Le composant majeur dans le PFPe était de l'acide galacturonique (44,2g/100g) lié par des liaisons (1,4) (estérifiées et non estérifiées). Sucres neutres tels que l'Ara (11,8g/100g), le Glc (11,8g/100g), le Rha (10,6g/100g), le Man (9,0g/100g), le Fuc (1,6g/100g), le Xyl (3,6g/100g) et du ribose (Rib) (1,3g/100g) ont été trouvés. La masse molaire du polysaccharide était de $6{,}0\times10^4$ g/mol. Les dates de spectroscopie infrarouge et de résonance magnétique nucléaire ont montré que la structure du PFPe avait une chaîne linéaire composée de HG et de RG-1 avec un faible rapport galacturonique/rhamnogalacturonane et un faible taux d'estérification (26,2 ± 0,8 mol%) (Silva *et al*., 2015). L'œdème de la patte induit par le carraghénane est caractérisé comme un modèle inflammatoire (Gupta *et al*., 2006 ; Silva *et al*., 2013). Le PFPe possède un effet anti-inflammatoire, par diminution de l'activité de la MPO et constitue un biomarqueur de

l'infiltration des neutrophiles confirmant la réduction de la migration des neutrophiles et du stress oxydatif, et la production de radicaux libres. Ces données renforcent l'utilisation ethnopharmacologique de *P. edulis* en médecine populaire (Klebanoff, 1999 ; Iwata *et al* 2010 ; Silva *et al*., 2015).

En médecine traditionnelle, les écorces de *Caesalpinia ferrea* sont utilisées pour traiter l'entérocolite, les rhumatismes et les plaies et dans les procédures expérimentales, ses extraits aqueux riches en polysaccharide présentaient un rendement de 3,1%, contenant une teneur élevée en glucides (44,3%, dont 8% d'acide uronique) et une teneur faible en protéines (6%). Ces polysaccharides ont des effets anti-inflammatoires, antiulcéreux, analgésique et cicatrisant (Pereira *et al*., 2016).

Les polysaccharides sont des substances qui modifient la réponse biologique à plusieurs facteurs de stress. La fraction soluble de polysaccharides (SFP), extraite du Cabernet de franc. L'analyse de la composition en monosaccharides de l'extrait a révélé un mélange complexe de polysaccharides, indiquant la présence d'arabinoglactanes, de mannanes et de pectines, qui pourraient être composé de rhamnogalacturonanes I et II en raison de la présence des sucres rares 2-O-Me-Xyl et 2-O-Me-Fuc. Aussi on trouve le glucose, qui pourrait appartenir à un glucane (Stipp *et al*., 2017). L'influence de l'inflammation sur le développement de la tumeur a déjà été rapportée chez des souris atteintes de tumeurs mammaires associées à un implant sous-cutané de polyéther-polyuréthane afin de stimuler le processus inflammatoire (Viana *et al*., 2015). L'activité de la MPO était supérieure dans les tumeurs de souris stimulées avec l'implant, accompagnée d'une augmentation de l'activité de la MPO. Le traitement avec 60mg/kg de la SFP présente une réduction de l'activité de la MPO. Fait intéressant, la réduction de la MPO était corrélée à des réductions de granulocytes et de monocytes sanguins chez les animaux traités au SFP (Stipp *et al*., 2017).

Le gingembre et ses extraits ont été utilisés traditionnellement comme remèdes anti-inflammatoires, l'extrait de gingembre brut a profondément inhibé cette réponse (Funk *et al*., 2009). Il existe des fragments chimiques supplémentaires, tels que les polysaccharides polaires qui sont également présents uniquement dans l'extrait brut, assure la médiation de cet effet anti-inflammatoire. Aussi, les extraits de curcuma contenant des composés polaires étaient capables d'inhiber l'inflammation dans un modèle de la polyarthrite rhumatoïde (Funk *et al*., 2006 ; Funk *et al*., 2009).

Les polysaccharides pectiques de différentes plantes, en fonction de leur structure, peuvent protéger les parois intestinales des mammifères contre les dommages et d'inhiber le

développement de l'inflammation. Dans le même temps, le galacturonane isolé de toute pectine, constituant la principale chaîne glucidique (épine dorsale) de sa macromolécule, présente un effet anti-inflammatoire marqué. Une diminution de la quantité de neutrophiles dans la paroi intestinale après une inflammation induite par l'acide acétique, indique que les effets anti-inflammatoires des pectines peuvent être basés sur leur influence sur l'activité fonctionnelle des leucocytes (Markov *et al*., 2011). Il a été démontré que les effets des pectines sur l'inflammation dépendent de la structure des régions linéaires et ramifiées de leurs macromolécules. Ainsi, le fragment de galacturonane de la macromolécule inhibe le développement de l'inflammation (Popov *et al*., 2005). La macromolécule de tous les polysaccharides de pectine est basée sur une chaîne linéaire de (1,4) résidus liés de l'acide α-D galactopyranosyluronique formant des fragments du galacturonane linéaire. Les pectines étudiées diffèrent par la structure des régions de ramification (Markov *et al*., 2011). La région de ramification de la macromolécule de comaruman CP est rhamnogalacturonane I (RG I) (Ovodova *et al*., 2005 ). Aliuman AS réduit l'activité de la MPO dans la paroi intestinale et la région de la lésion, mais n'a aucun effet sur le degré de la lésion (Markov *et al*., 2011). Les pectines isolées de la myrtille *Comarum palustre* L. (Popov *et al*., 2006b), de la petite canneberge *Vaccinium oxycoccos* L. (Popov *et al*., 2006a), et de la tylose du bois de serpent *Rauvolfia serperntina* (Popov *et al*., 2007), inhibent le développement d'une inflammation intestinale chez la souris (Markov *et al*., 2011). Dans le même temps, la chaîne glucidique principale de toute macromolécule de pectine, le galactopyranosyluronane ± (1,4) D, présente un potentiel anti-inflammatoire. Il semble que la structure ou la disposition des chaînes latérales sur l'épine dorsale de la macromolécule de pectine soit le facteur déterminant, déterminer l'effet des pectines sur l'inflammation. Il est probable que les chaînes latérales des pectines ayant un effet anti-inflammatoire sont moins résistantes aux facteurs hydrolytiques de la cavité gastro-intestinale des mammifères, ce qui facilite la formation de fragments de galacturonane faiblement ramifiés interagissant avec les cellules cibles (Markov *et al*., 2011).

Il a été démontré que des produits bioactifs isolés à partir de plantes médicinales telles que *Garcinia buchananii* et *Ficus aurantiaca* Griff étaient des anti-inflammatoires en inhibant la production de ROS de neutrophiles (Mawa *et al*., 2016). Les extraits de plantes médicinales sont généralement fabriqués avec de l'eau et des polysaccharides solubles dans l'eau isolés de plantes ont beaucoup attiré l'attention en raison de leur large spectre de propriétés thérapeutiques et de leur toxicité relativement faible (Schepetkin *et al*., 2006). Un extrait de polysaccharide hydrosoluble provenant d'une plante endémique qui se développe en Afrique du Nord, en particulier au Maroc et en Algérie, *Anvillea garcinii* Coss. & Durieu (Anv), a des effets anti-inflammatoires. Les guérisseurs traditionnels savent que cette plante possède plusieurs propriétés

médicinales dans les pays d'Afrique du Nord (Rimbau *et al*., 1999). Par exemple, leurs extraits bruts et leurs infusions sont largement utilisés pour traiter les rhumes, le diabète, les maladies de l'estomac et du foie souvent associées à une inflammation. Ils sont également antiseptiques et antispasmodiques (Bellakhdar *et al*., 1991 ; Jamila *et al*., 2014 ; Boukemara *et al*., 2016). Cet extrait polysaccharidique inhibe efficacement la production de ROS et la dégranulation des phagocytes humains primaires. En effet, Anv inhibe la production d'anions superoxyde induite par le fMLF et le PMA dans les neutrophiles humains. Anv inhibe l'activation de la PKC induite par le PMA, ce qui entraîne l'inhibition de la phosphorylation et de la translocation induites par le PMA de la p47phox de la sous-unité NADPH oxydase. En outre, l'extrait d'Anv a inhibé la dégranulation du la MPO. Ces polysaccharides isolés à partir d'Anv pourraient exercer un puissant effet anti-inflammatoire en inhibant les fonctions neutrophiles et en limitant la propagation des ROS aux tissus voisins (Boukemara *et al*., 2016).

Récemment, il a été montré que les polysaccharides solubles dans l'eau extraits de *Bupleurum chinense* inhibaient l'activation de rac-1. Le trafic du cytosolique rac-1 ou rac-2 vers la membrane plasmique est crucial pour l'assemblage de la NADPH oxydase fonctionnelle et peut constituer un site d'action inhibitrice pour les extraits de polysaccharide. De plus, rac-2 serve joue un rôle sélectif dans la dégranulation des neutrophiles, processus indépendant de la production de ROS (Abdel-Latif *et al*., 2004 ; Tong *et al*., 2013).

De plus, il a été démontré que l'extrait aqueux anti-inflammatoire de *Punia granatum* inhibe sélectivement l'activité de la MPO des neutrophiles humains, qui dépend du processus de dégranulation (Bachoual *et al*., 2011).

### I.2.2.- Polysaccharides des algues

Les algues se trouvent sur les côtes du monde entier. De nombreuses espèces de macroalgues marines sont utilisées comme sources de nourriture et sont riches en polysaccharides sulfatés (Kusaykin *et al*., 2008 ; Wijesekara *et al*., 2011). Récemment, il y a eu un intérêt croissant pour le criblage systématique de l'activité biologique des polysaccharides sulfatés (PLS) isolés d'algues marines. Certains de ces polysaccharides ont été transformés en nouveaux médicaments (Kaji *et al*., 2004 ; Zhou *et al*., 2004). En général, l'activité biologique d'un polysaccharide provenant d'algues marines est liée à sa taille moléculaire anti-inflammatoires, qui le rendent pertinent pour les applications pharmaceutiques (Rocha *et al*., 2006 ; Batista *et al*., 2014). *Agardhiella ramosissima* est une algue rouge appartenant à la famille des Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta). Les espèces de l'ordre des Gigartinales produisent un PLS de type carraghénane, qui est un polymère comprenant des unités de 1-D-

galactopyranose liées (1,3) en alternance, ainsi que des unités de D-galactopyranose liées en (1,4) qui sont fréquemment sous la forme 3,6-anhydro (Pereira *et al*., 2003 ; Usov et Anatolii, 2011).

L'injection 30 mg $kg^{-1}$ de PLS inhibe les dommages induits par les neutrophiles en réduisant l'activité de la MPO dans les pattes des souris (Chaves *et al*., 2013). Le groupe sous-plantaire de carraghénanes a montré une activité de la MPO à une concentration de 18,97±2,53UMPO/mg de tissu plantaire, tandis que le groupe traité avec PLS a présenté une activité de la MPO de 2,76±1,17UMPO/mg de tissu plantaire, ce qui équivaut à une réduction de 85,45% (Batista *et al*., 2014).

Les fucoïdanes représentent un groupe intriguant de polysaccharides naturels qui pourraient avoir des applications thérapeutiques prometteuses dans divers contextes cliniques. Comme les fucoïdanes d'origine des algues se caractérisent par une grande variété d'activités biologiques et par une structure extrêmement complexe et hétérogène, qui varie évidemment d'une espèce à l'autre (Cumashi *et al*., 2007). Contrairement aux fucoïdanes sulfatés d'origine animale, les fucoïdanes des algues sont hétérogènes et représentent les mélanges de polysaccharides structurellement apparentés avec certaines variations de la teneur en unités glucidiques (L- fucopyranose et non fucose) et de substituants non glucidiques (groupes sulfate et acétyle) (Cumashi *et al*., 2007). L'analyse par chromatographie de perméation de gel sur des échantillons de fucoïdane a démontré leur profil d'élution et leur domination comparables aux fractions de polysaccharide d'un poids moléculaire de 200–500 kDa (Cumashi *et al*., 2007). Les fucoïdanes obtenus à partir d'espèces d'algues brunes différentes de celles de *Fucus vesiculosus* et *Ascophyllum nodosum*, traditionnellement étudiées, peuvent agir en tant qu'inhibiteurs de l'inflammation. La ramification 2-O-α-D-glucuronyle a une importance dans la diminution de plusieurs activités biologiques (Cumashi *et al*., 2007).

### I.2.3.- Polysaccharides des champignons

*Auricularia auricular-judae* est un champignon médicinal comestible appartenant aux champignons basidiomycotina, principalement répandus en Chine, à Taiwan, en Thaïlande et en Indonésie. Le fruit *d'Auricularia auricular-judae* est riche en hétéro-polysaccharides-*Auricularia auricular-judae* polysaccharide (AAP) constitués d'un squelette de résidus D-Glc avec différentes chaînes de résidus de ramification β-(1,3), tels que le Man, le Glc, le Xyl et l'acide glucuronique (Zhuan-Yun *et al*., 2015). Il a été prouvé que ce polysaccharide présente non seulement une valeur nutritionnelle extrêmement élevée, mais également diverses fonctions pharmacologiques chez l'homme (Zhuan-Yun *et al*., 2015). Dans une étude, l'activité de la MPO

augmentait de manière significative après l'administration de LPS. Et après, le prétraitement de l'AAP a diminué de manière significative l'activité de la MPO et réduit l'infiltration des neutrophiles (Zhuan-Yun *et al*., 2015).

*Pleurotus geesteranus* est largement consommé dans le monde entier et apporte des valeurs nutritionnelles liées aux activités de promotion de la santé en raison de ses effets anti-inflammatoires, antioxydants, hépatoprotecteurs, et hypoglycémiques (Lu *et al*., 2011 ; Zhang *et al*., 2013 ; Gao *et al*., 2017 ; Song *et al*., 2018). De plus en plus d'études ont démontré que de nombreux composants bioactifs abondants, notamment, des polysaccharides peuvent être isolés de *Pleurotus geesteranus*. Ces composants ont fait l'objet d'une attention particulière pour leurs effets anti-inflammatoire (Gao *et al*., 2017), leurs effets hépatoprotecteurs (Liu *et al*., 2014). L'analyse physicochimique a montré que les polysaccharides intracellulaires du mycélium de *P. geesteranus* (IMPP) contient principalement six monosaccharides, dont Fucose (Fuc), Ara , Xyl, Man, Gal et de Glc, dans les pourcentages en masse de 43,10%, 13,43%, 6,48%, 10,71%, 10,65% et 15,63%, avec un rapport molaire de 9.07: 3.09: 1.49: 2.05: 2.04: 3.00, et le monosaccharide majeur de l'IMPP était Fuc. Ces polysaccharides ont montré des effets anti-inflammatoires en régulant l'activité de la MPO et de l'infiltration de neutrophiles (Song *et al*., 2018). Les maladies alcooliques du foie (ALD) sont parmi les maladies du foie les plus courantes. Ils présentent les mécanismes cliniques de la consommation excessive d'alcool (Mishra *et al*., 2011 ; Suk *et al*., 2014). La progression clinique de l'ALD est habituellement appelée initialement inflammation aiguë, suivie de l'hépatite alcoolique, de la fibrose et de la cirrhose, puis du cancer (Lu *et al*., 2011 ; Li *et al*., 2015a). Malheureusement, le niveau de la MPO, est significativement augmenté, entraînant des lésions hépatocytaires (Mouzaoui *et al*., 2012). L'IMPP des présentait des anti-inflammatoires contre l'ALD en améliorant le statut les effets anti-inflammatoires, et cette activité relative à la richesse en Fuc, cette richesse pourraient jouer un rôle important dans la garantie de ces activités (Song *et al*., 2018). Les propriétés de polysaccharides typiques du type pyranne par liaison β-glycosidique riche en Fuc. Li *et al*. (2015b) ont découvert que le fucoïdane naturel, riche en Fuc dérivé d'algues brunes, peut réduire la réponse inflammatoire chez un modèle de lésion hépatique chez le rat. Le Fuc est le composant actif important de l'IMPP contribuant à maintenir les effets anti-inflammatoires (Song *et al*., 2018).

*Hypsizygus marmoreus* est l'un des champignons les plus populaires dans les pays asiatiques grâce sa merveilleuse qualité organoleptique, *H. marmoreus* a été largement considéré comme un complément nutritionnel pour le maintien de la santé et la prévention des maladies, contribuant à ses composants bénéfiques (Chang *et al*., 2009). Des littératures antérieures ont

prouvés que la maladie pulmonaire induite par les LPS est accompagnée de l'agrégation des neutrophiles (Jiang *et al.*, 2016). Par rapport à la littérature de Jiang *et al*. (2016), Liu *et al*. (2018) trouvent que le mycélium sélénium polysaccharides (MSPS) isolé de *Hypsizigus marmoreus*, peut être l'agent potentiel pour se protéger contre la toxicité du LPS en atténuant les activités du la MPO. MSPS était une petite molécule polysaccharidique avec un poids moléculaire de $1{,}56\times10^3$. Il a été rapporté que les polysaccharides de faible poids moléculaire avaient des activités biologiques relativement élevées (Yang *et al*., 2008). MSPS était composé de six monosaccharides Rha 0.06%, Fuc 6.33%, Xyl 1.24%, Man 8.06%, Gal 17.96% et de Glc était le composant principal par 66.35%, ce qui montre que le MSPS était un hétéropolysaccharide. En outre, parallèlement à l'analyse de l'activité, le glucose jouer un rôle vital dans le maintien des effets anti-inflammatoires (Liu *et al*., 2018).

### I.2.4.- Polysaccharides des animaux

Le polysaccharide A (VRP327A), et avec le polysaccharide B (VRP327B) isolés de l'intestin du tunicier *Ascidiella aspersa* (plus communément appelée escarres de mer) avaient des poids moléculaires > 100kDa. Le principal trait distinctif du polysaccharide B avec A était la présence de niveaux plus élevés de le Fuc (> 20%) et la N-acétyl glucosamine (GlcNAc) (> 35%) en B (Thomson *et al*., 2016). Ces deux polysaccharides ont été entièrement caractérisés structurellement par RMN. Le VRP327A est un sulfate de dermatane hautement sulfaté, qui contient de l'acide uronique non sulfaté et de la N-acétylgalactosamine (GalNAc) de différents modèles de sulfatation, le principal composant étant le GalNAc4,6S. Alors que, le VRP327B est une molécule sulfatée fucosylée, contenant un motif monosaccharide répétitif de β-(1,3)-D-GlcNAc, dont environ la moitié est fucosylée sur C4. Ces polysaccharides sont intéressants car ils présentent des propriétés anti-inflammatoires (Thomson *et al*., 2016).

Le stimulus inflammatoire, le zymosan, a provoqué un infiltrat riche en neutrophiles 4 h après l'injection dans la cavité péritonéale, les neutrophiles représentant 75% de la population cellulaire totale. L'administration du VRP327A par voie intraveineuse, 15 min avant l'injection intrapéritonéale de zymosan, a inhibé cette réponse en fonction de la dose. Les animaux exposés à VRP327A (0,1 à 10mg/kg) ont produit une inhibition dépendante de la dose du recrutement des neutrophiles dans la cavité péritonéale en réponse au zymosan. Le fucoidan, un polysaccharide de référence isolé à partir de *Fucus vesiculosis*, à des doses de 1 à 100 mg/kg a été utilisé comme contrôle positif et a également provoqué une inhibition, liée à la dose, du recrutement de neutrophiles dans la cavité péritonéale après administration de zymosan (Thomson *et al*., 2016). Les neutrophiles humains traités *in vitro* avec VRP327A, et avec VRP327B, ou au fucoïdane ont

inhibé la migration transendothéliale de neutrophiles était inhibée jusqu'à 30%, ce qui n'était pas significatif. Le fait que les oligosaccharides de ces polysaccharides ont la possibilité de les utiliser comme modèles de faible poids moléculaire dans la recherche de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. Cette étude démontre clairement qu'une activité anti-inflammatoire est présente dans les polysaccharides ayant une gamme de poids moléculaires très large, y compris certains des petits dérivés d'oligosaccharides de VRP327. Les oligosaccharides de sources marines pourraient constituer une source utile de nouvelles molécules anti-inflammatoires dépourvues d'activité anticoagulante pour le traitement de maladies telles que l'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique (Thomson *et al.*, 2016).

Le tableau 03 montre la composition, les propriétes et l'effet anti-inflammatoire de quelques polysaccharides naturels.

**Tableau 03-** Effet anti-inflammatoire des polysaccharides naturels

| Origine | Nom commun | Polysaccharide | Composition | Propriétés | Effet | Référence |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Champignons** | *Auricularia auricular-judae* | *Auricularia auricular-judae* polysaccharide (AAP) | Glc<br>Man<br>Xyl<br>Acide glucuronique | Squelette de résidus D-glucose avec différentes chaînes de résidus de ramification β-(1,3) | Diminue l'activité de MPO | (Zhuan-Yun *et al*., 2015) |
| | *Pleurotus geesteranus* | Mycélium polysaccharides intracellulaires de *Pleurotus geesteranus* (IMPP) | Fuc 43,10%,<br>Ara 13,43%,<br>Xyl 6,48%,<br>Man 10,71%,<br>Gal 10,65%<br>Glu 15,63% | Type pyranne obtenus par liaison β-glycosidique riche en fucose | Diminue l'activité de MPO | (Song *et al*., 2018) |
| | *Hypsizygus marmoreus* | Mycélium sélénium polysaccharides (MSPS) | Rha 0.06%<br>Fuc 6.33%,<br>Xyl 1.24%,<br>Man 8.06%,<br>Gal 17.96%<br>Glc 66.35% | Hétéropolysaccharide<br>Petit molécule | Diminue l'activité de MPO | (Liu *et al*., 2018) |
| **Plantes** | *Lycium barbarum* | Polysaccharide de *Lycium barbarum* (LBP) | Ara<br>Rha<br>Xyl<br>Man<br>Gal<br>Glc | Hétéropolysaccharide<br>PM 1.524 x$10^5$<br>Les squellete glycanniques se sont des α- (1, 6) - D glucanes ou α - (1, 4) - D polygalacturonans | Effet anti-inflammatoire | (Tian et Wang, 2006 ; Amagase et Farnsworth, 2011) |
| | *Plantago asiatica* | *Plantago asiatica* L. polysaccharide (PLP) | | 1894 kDa | Réduction de l'activité de la MPO | (Huang *et al*., 2018) |
| | *Passiflora edulis* | Fraction polysaccharidique de *Passiflora edulis* (PFPe) | Acide galacturonique<br>Ara<br>Glc<br>Rha<br>Man<br>Fuc<br>Xyl<br>Rib | Structures linéaires<br>Homogalacturonane (HG) et Rhamnogalacturonane-1 (RG-1) ramifiées en sucre neutre<br>Masse molaire 6,0×$10^4$ g / mol | Diminué l'activité de la MPO | (Silva *et al*., 2015) |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Caesalpinia ferrea* | Polysaccharide de *Caesalpinia ferrea* | Glucides 44,3% dont 8% d'acide uronique | Hétéropolysaccharide | Effet anti-inflammatoire | (Pereira *et al*., 2016) |
| | Cabernet de franc | Fraction soluble de polysaccharide (SFP) | Ara<br>Man<br>Rha<br>Gal<br>Glc<br>2-O-Me-Xyl<br>2-O -Me-Fuc<br>Acide galacturonique | | Réduit l'activité enzymatique de MPO | (Stipp *et al*., 2017) |
| **Algues** | *Comarum palustre* | Crude polysaccharide (CP) | Rha 35%<br>Ara 17%<br>Glc 1%<br>Gal 47% | Hétéropolysaccharide<br>Galacturonane | Effet anti-inflammatoire | (Popov *et al*., 2006b) |
| | *Allium sativum* | Aliuman AS | | Une chaîne linéaire de (1,4) résidus liés de l'acide α-D galactopyranosyluronique | Réduit l'activité de la MPO | (Markov *et al*., 2011) |
| | *Fucus vesiculosus* | Fucoïdane | Fuc 26.1 %<br>Xyl 2.4 %<br>Man 3.1%<br>Glc 2.2%<br>Gal 5.0%<br>Acide uronique 10.3% | PM 200–500 kDa<br>Des unités glucidiques (L-fucopyranose et non fucose) et non glucidiques (groupes sulfate et acétyle) | Activité anti-inflammatoire | (Cumashi *et al*., 2007) |
| | *Ascophyllum nodosum* | Fucoïdane | Fuc 26.6 %<br>Xyl 4.4 %<br>Man 2.6%<br>Glc 1.1%<br>Gal 4.7%<br>Acide uronique 9.4% | PM 200–500 kDa<br>Des unités glucidiques (L-fucopyranose et non fucose) et non glucidiques (groupes sulfate et acétyle) | Activité anti-inflammatoire | (Cumashi *et al*., 2007) |
| | *Agardhiella ramosissima* | Polysaccharide sulfaté | | Des unités 1-D-galactopyranose liées (1,3)<br>Des unités de D-galactopyranose liées en (1,4) qui sont fréquemment sous la forme 3,6-anhydro | Réduit l'activité de MPO | (Batista *et al*., 2014) |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Animal** | *Ascidiella aspersa* | Polysaccharide A (VRP327A) | Fuc 4.28 %<br>Xyl 0.8%<br>Gal 2.54%<br>Glc 0.55%<br>Acide glucuronique 1.61%<br>GalNAc 40.9%<br>GlcNAc 8.4 % | PM > 100 kDa<br>Est un dermatane sulfate | Activité anti-inflammatoire | (Thomson *et al.*, 2016) |
| | | Polysaccharide B (VRP327B) | Rha 3.45%<br>Fuc 25.16 %<br>Xyl 0.84%<br>Man 0.42%<br>Gal 1.67%<br>Glc 0.48%<br>Glc A 1.28%<br>GalNAc 8.54%<br>GlcNAc 48.31 % | PM> 100 kDa<br>Une molécule sulfatée fucosylée | Activité anti-inflammatoire | (Thomson *et al.*, 2016) |

# *Chapitre II*

# *Méthodologie de travail*

**II.1.- Principe d'étude**

Au cours des dernières années, le dépistage d'agents thérapeutiques à partir de plantes a suscité un vif intérêt. Traditionnellement, *Plantago major L.* et *Plantago asiatica L.* ont été largement utilisées pour traiter diverses maladies à Taiwan. Ils auraient des propriétés thérapeutiques telles que des propriétés antipyrétiques, diurétiques, cicatrisantes, ainsi que des effets multiples sur la prévention du cancer du sein, de la conjonctivite et de l'hépatite (Lin *et al.*, 1990 ; Lithander, 1992 ; Chiang *et al*., 2003). Beaucoup d'études se sont intéressées à l'étude des polysaccharides isolés à partir de plantes médicinales en raison de leur large spectre de propriétés thérapeutiques y compris les propriétés anti-inflammatoires, immunostimulants, immunomodulatrices et antitumorales (Schepetkin *et al*., 2006 ; Boukemara, 2016).

L'inflammation est un processus physiologique qui aide normalement à lutter contre l'infection et contribue à la réparation des tissus (Meziti, 2018). Les neutrophiles constituent un des puissants systèmes de défense contre les agents pathogènes et qui jouent un rôle primordial dans le processus inflammatoire, elles neutralisent les agents agresseurs par la phagocytose, la libération des enzymes hydrolytiques et la production des ROS. Cependant, lorsque les mécanismes de régulation de ces différentes réponses échouent, le recrutement continu des neutrophiles vers le site inflammatoire et leur activation excessive causent des lésions tissulaires graves, qui sont à l'origine de nombreuses maladies inflammatoires telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, l'Alzheimer, l'athérosclérose et le cancer (Karnouf, 2010).

La réponse inflammatoire implique une réponse oxydante du neutrophile appelée flambée respiratoire. Elle est déclenchée par la NADPH oxydase, une enzyme clé qui permet de former l'$O_2^{\cdot -}$, la première espèce activée de l'oxygène, d'où dérivent principalement les autres ROS. La cascade de formation des ROS a leurs tours activent une autre enzyme ; la MPO qui génère l'HOCl hautement toxique. Ces espèces produites sont nécessaires pour la dégradation des agents pathogènes, mais leur libération importante dans le milieu extracellulaire peut être responsable de dommages aux cellules voisines en causant des oxydations au niveau des lipides, protéines, hydrates de carbone et acides nucléiques (Derochette, 2015).

Devant l'augmentation considérable des troubles inflammatoires et les effets secondaires des anti-inflammatoires synthétiques, une plus grande attention est concentrée sur la recherche de composants bioactifs à partir de plantes médicinales qui pourraient traiter les désordres inflammatoires tels que la modulation de l'hyperactivation des neutrophiles sans effets négatifs (Meziti, 2018). Dans ce contexte, les polysaccharides extraits de plantes peuvent réduire les processus inflammatoires en interférant avec des molécules ou des mécanismes spécifiques avec

faible incidence d'effets secondaires et de toxicité et moindre coût (Schepetkin *et al*., 2006 ; Silva *et al*., 2015). Tong *et al*. (2013) ont montré l'effet inhibiteur des polysaccharides solubles issus de *Bupleurum chinense* sur l'activité catalytique de la NADPH oxydase. Ainsi, des études portes sur les polysaccharides d'*Anvillea garcinii* montrent un effet anti-inflammatoire par l'inhibition de la production des ROS (Boukemara *et al*., 2016). Huang *et al.* (2018) ont signalé que les polysaccharides isolés à partir *Plantago asiatica* L peuvent réduire l'activité de la MPO.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire est basée sur la mesure de l'état fonctionnel des neutrophiles. Il repose sur la mesure de l'activité de deux enzymes; la NADPH oxydase comme producteurs d'$O_2^{\cdot -}$ et la MPO, un indicateur de l'infiltration de neutrophiles au site inflammatoire.

Le présent travail consiste à étudier l'activité anti-inflammatoire de polysaccharides extraits de deux plantes spontanées à caractère médicinal, répartis dans la région de Ghardaïa. Il s'agit de *Plantago albicans* et de *Plantago notata*.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des polysaccharides *in vitro* a pour but de montrer leur pouvoir immuno-modulateur vis-à-vis le système immunitaire, par la détermination de la capacité de réduire l'explosion oxydative présentée par l'inhibition de la NADPH oxydase, et d'inhiber l'activité enzymatique de la MPO présentée par la réduction de la peroxydation de 4-aminoantipyrine en Quinone imine.

## II.2.- Matériel d'étude

### II.2.1.- Solvants et réactifs

La nature, l'origine, la masse molaire, la densité et la pureté des solvants et des réactifs utilisés au cours de ce travail sont indiquées dans le tableau 04.

#### II.2.1.1.- Solutions de travail

Les solutions utilisées pour l'isolement des neutrophiles humain sont : la solution de Hanks' Balanced Salts sans $Ca^{+2}$ et $Mg^{+2}$ ($HBSS^1$)/ avec $Ca^{+2}$ et $Mg^{+2}$ ($HBSS^2$) ; Tampon Phosphate Saline ($PBS^1$) ; $PBS^1$ à 1.8% NaCl (Karnouf, 2010).

Les solutions utilisées pour mesurer l'activité de la NADPH oxydase sont : $HBSS^2$ ; solution du PMA ; solution cytochrome C ; $PBS^1$ (Boudoukha, 2018).

Les solutions utilisées pour mesurer l'activité de la MPO sont : $HBSS^2$ ; $PBS^1$ ; Tampon Phosphate Sodium ($PBS^2$) ; $H_2O_2$ ; acide sulfurique ; solution de 4-aminoantipyrine et solution du PMA (Meziti, 2018).

La nature, la concentration, le rôle, la composition et la méthode de préparation des solutions d'HCl, NaOH utilisées dans la préparation des solutions tampons au cours de ce travail sont indiquées dans le tableau 05. Les appareils sont mentionnés dans le tableau 06.

### II.2.1.1.1.-Tampon phosphate saline (PBS[1]), pH 7.4

C'est une solution Saline Tamponnée au Phosphate. Elle est composée de 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.424g de $Na_2HPO_42H_2O$, 0.2g de $KH_2PO_4$ et NaOH 1N (Young et *al.*, 2012).

#### II.2.1.1.1.1.- Mode opératoire

Le PBS[1] est préparé selon la méthode de Young et *al.* (2012) modifiée, comme il est indiqué ci-dessous.

1. Peser tous les sels, les placer dans le bécher ;
2. Introduire le barreau d'agitation magnétique dans le bécher ;
3. Ajouter 800ml d'eau distillée aux sels ;
4. Placer le bécher sur l'agitateur magnétique avec plaque chauffante pour permettre aux sels de se dissoudre ;
5. Une fois que tous les sels sont dissous, et ajuster avec l'eau distillé le volume de la solution au volume final exact nécessaire ;
6. Ajuster le pH de la PBS[1] à pH 7.4 à l'aide de la NaOH 1N ;
7. Répartir la PBS[1] dans des flacons et autoclaver à 121°C pendant 20 mn ;
8. Stocker à température ambiante.

### II.2.1.1.2.-Tampon Phosphate Saline (PBS[1]), pH 7.4 à 1.8% NaCl

C'est une solution Saline Tamponnée au Phosphate. Elle est composé de 18g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.424g de $Na_2HPO_42H_2O$, 0.2g de $KH_2PO_4$ et NaOH 1N (Young et *al.*, 2012).

#### II.2.1.1.2.1.- Mode opératoire

Il a été suivi le même mode opératoire de PBS[1] (II.2.1.1.1.1) sauf qu'à la place de 8g de NaCl, il a été ajouté 18g de NaCl.

### II.2.1.1.3.- Hanks' Balanced Salts Solution sans $Ca^{+2}$ et $Mg^{+2}$ (HBSS[1]), pH 7.4

C'est une solution Saline Tamponnée au Phosphate. Elle est composé de 8g de NaCl, 0.4g de KCl, 0.06g de $Na_2HPO_42H_2O$, 0.06g de $KH_2PO_4$, 1g de glucose, 0.35g de $NaHCO_3$ (Hanks, 1975).

#### II.2.1.1.3.1.-Mode opératoire

La solution de HBSS[1] est préparée selon la méthode de Sigma Aldrich modifiée, comme il est indiqué ci-dessous.

1. Peser tous les différentes composés ;
2. Introduire le barreau d'agitation magnétique dans le bécher ;
3. Ajouter 200ml d'eau distillée dans le bécher ;
4. Placer le bécher sur un agitateur magnétique pour permettre aux sels de se dissoudre ;
5. Ajouter les composés dans l'ordre suivants ;
6. Ajouter 8g de NaCl à la solution ;
7. Ajouter 0.4g de KCl à la solution ;
8. Ajouter 0.06g de $Na_2HPO_42H_2O$ à la solution ;
9. Ajouter 0.06g de $KH_2PO_4$ à la solution ;
10. Ajoutez 1g de glucose à la solution ;
11. Ajouter 0.35g de $NaHCO_3$ à la solution ;
12. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume de 1 L ;
13. Filtrer la HBSS[1] avec des filtres stérilisants et le répartir dans des flacons ;
14. Stocker dans le réfrigérateur.

**Tableau 04-** Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation

| Produit | Fournisseur | Caractéristiques | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Forme | Formule chimique | M.molaie (g/mol) | Densité (g/cm3) | Pureté (%) |
| 4-aminoantipyrine | SIGMA ALDRICH | Liquide | $C_{11}H_{13}N_3O$ | 203.24 | 0.8 | / |
| Acide chlorhydrique | SIGMA-ALDRICH | Liquide | HCl | 36.46 | 1.19 | 37 |
| Acide sulfurique | VWR PROLABO | Liquide | $H_2SO_4$ | 98.079 | 1.84 | 95 – 97 |
| Bicarbonate de sodium | BIOCHEM CHEMOPHARMA | Poudre | $NaHCO_3$ | 84.007 | 2.2 | 99.5 |
| Chlorure de calcium | BIOCHEM CHEMOPHARMA | Poudre | $CaCl_2$ | 110.98 | 2.15 | 99.9 |
| Chlorure de potassium | EDEN LABO | Poudre | KCl | 74.55 | 1.98 | 99 |
| Chlorure de sodium | SIGMA ALDRICH | Poudre | NaCl | 58.44 | 2.16 | 99.5 |
| Cytochrome C | SIGMA ALDRICH | Liquide | / | / | / | / |
| Diclofénac | SANOFI | Poudre | $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ | 318.13 | / | / |
| Disodium phosphate dihydrate | BIOCHEM CHEMOPHARMA | Poudre | $Na_2HPO_42H_2O$ | 177.99 | 1.63 | 99.5 |
| Glucose | SIGMA ALDRICH | Poudre | $C_6H_{12}O_6$ | 180.16 | 1.54 | 99.5 |
| Hydroxyde de sodium | EDEN LABO | Poudre | NaOH | 39.997 | 2.13 | 99 |
| Indométacine | SANDOZ | Poudre | $C_{19}H_{16}ClNO_4$ | 357.79 | / | / |
| Peroxyde d'hydrogène | SIGMA ALDRICH | Liquide | $H_2O_2$ | 34.0147 | 1.45 | / |
| Phosphate de potassium dibasique | BIOCHEM CHEMOPHARMA | Poudre | $KH_2PO_4$ | 136.09 | 2.338 | 99 |
| PMA | SIGMA ALDRICH | Liquide | $C_{36}H_{56}O_8$ | 616.83 | / | / |
| Sodium phosphate dibasic | SIGMA ALDRICH | Poudre | $Na_2HPO_4$ | 141.96 | 1.7 | 99 |
| Sodium phosphate monobasic | SIGMA ALDRICH | Poudre | $NaH_2PO_4$ | 119.98 | 1.915 | 99 |
| Sulfate de Magnesium Heptahydrate | BIOCHEM CHEMOPHARMA | Poudre | $MgSO_47H_2$ | 246.47 | / | 99.5-103 |

**Tableau 05-** Caractéristiques physicochimiques et méthodes de préparation des solutions de HCl et NaOH (Alton et *al*., 1992; Nahm et Burton, 2011)

| Solution | Concentration | Nature | Etat | Rôle | Méthode de préparation |
|---|---|---|---|---|---|
| HCl | 1N | Acide | Non stérile | Ajustement de pH | Ajouter 8.33 ml de l'HCl 12N aux 91.67ml d'eau distillée. |
| NaOH | 1N | Base | Non stérile | Ajustement de pH | Dissoudre 4 g de NaOH dans 100 ml d'eau distillée |

**Tableau 06-** Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation

| Appareil | Fournisseur | Type | Lieu de fabrication |
|---|---|---|---|
| Agitateur magnétique | VELP CSIENTIFICA | F20520162 | EUROPE |
| Autoclave | PB INTERNATIONAL | 0178107 3707G3, N° série 028717 | USA |
| Bain marie | MEMMERT | MEMMERTGMBH. WB 7. NENNTEMP ; 100 °C | GERMANY |
| Balance | OHAUS | DISOVERY DV 215CD OHAUS. | USA |
| Centrifugeuse | SIGMA | SIGMA. 15PK, 14000 RPM. | GERMANY |
| Etuve | KARL KOLB | D-6072 | GERMANY |
| Hotte | TEL STAR | TELSTAR AV-100. MODELE50/60 HZ, 0.6KW | SPAIN |
| Micropipette | SOCOREX | ACURA 821. 200-1000ML | SWIS |
| Microscope optique | MICROS | MC50LED N° série 2401986 | AUSTRALIE |
| pH mètre | EUTECH INSTRUMENTS | PHSCAN20. YM4D051561 | USA |
| Spectrophotomètre | SHIMADZU | UV-MINI-1240.UV-VIS SPECTROPHOTOMETRE | CHINA |
| Vortex | STUART EQUIPMENT | BIOCOTE STUART SA8 VORTEX | USA |

### II.2.1.1.4.- Hanks' Balanced Salts Solution avec $Ca^{+2}$ et $Mg^{+2}$ ($HBSS^2$), pH 7.4

C'est une solution tamponnée qui contient un groupe collectif de sels. Elle est composé de 8g de NaCl, 0.4g de KCl, 0.06g de $Na_2HPO_42H_2O$, 0.06g de $KH_2PO_4$, 0.14g de $CaCl_2$, 0.1g de $MgSO_47H_2O$, 1g de glucose, 0.35g de $NaHCO_3$ (Hanks, 1975).

#### II.2.1.1.4.1.- Mode opératoire

La solution $HBSS^2$ est préparée selon la méthode de Sigma Aldrich modifiée, comme il est indiqué ci-dessous:

1. Peser tous les différentes composés ;
2. Introduire le barreau d'agitation magnétique dans le bécher ;
3. Ajouter 200ml d'eau distillée dans le bécher ;
4. Placer le bécher sur agitateur magnétique pour permettre aux sels de se dissoudre ;
5. Ajouter dans le bécher les composés dans l'ordre suivants ;
6. Ajouter 8g de NaCl à la solution ;
7. Ajouter 0.4g de KCl à la solution ;
8. Ajouter 0.14g de $CaCl_2$ à la solution ;
9. Ajouter 0.1g de $MgSO_47H_2O$ à la solution ;
10. Ajouter 0.06g de $Na_2HPO_42H_2O$ à la solution ;
11. Ajouter 0.06g de $KH_2PO_4$ à la solution ;
12. Ajoutez 1g de glucose à la solution ;
13. Ajouter 350mg de $NaHCO_3$ à la solution ;
14. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume de 1 L ;
15. Filtre la $HBSS^2$ avec des filtres stérilisants et le répartir dans des flacons ;
16. Stocker dans le réfrigérateur.

### II.2.1.1.5.- Tampon Phosphate de Sodium ($PBS^2$), pH 6.0

C'est une solution Tampon au Phosphate de Sodium. Elle est composée de 13.8g de $NaH_2PO_4$ (monobasique) et 14.2g de $Na_2HPO_4$ (dibasique)

**II.2.1.1.5.1.-Mode opératoire**

1. Peser les différentes composés ;
2. Introduire le barreau d'agitation magnétique dans le bécher ;
3. Ajouter 800 ml d'eau distillée dans le bécher ;
4. Placer le bécher sur agitateur magnétique pour permettre au composé de se dissoudre ;
5. Ajouter 13.8g de $NaH_2PO_4$ dans le bécher ;
6. Une fois que $NaH_2PO_4$ est dissous, et ajuster le volume de la solution au volume de 1L ;
7. Dans un autre bécher qui contient 800ml d'eau distillée, dissolver 14.2g de $Na_2HPO_4$ ;
8. Compléter le volume jusqu'à 1L ;
9. Pour obtenir une solution de $PBS^2$ 0.1M à pH 6.0. Mélanger 877ml de la solution monobasique ($NaH_2PO_4$) avec 123ml de la solution dibasique ($Na_2HPO_4$) ;
10. Répartir la $PBS^2$ dans des flacons et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 20 mn ;
11. Stocker à température ambiante.

**II.2.2.-Matériel biologique**

**II.2.2.1.-Lyophilisats des polysaccharides hydrosolubles**

Les lyophilisats des extraits des polysaccharides hydrosolubles issus des graines de *Plantago notata* (PSPn) et de *Plantago albicans* (PSPc) et les caractéristiques des différentes espèces choisies sont consignées dans le tableau 07.

**II.2.2.2.- Sang humain**

Le sang humain est obtenu par prélèvement veineux au pli du coude des volontaires sains de sexe masculin, âgé de 25 à 38 ans, non fumeurs ayant certifié n'être sous aucune médication de toutes sorte au moins durant les derniers 15 jours qui ont précédé le prélèvement (Koko *et al*., 2008). Le sang est prélevé fraîchement le jour même de son utilisation au niveau de laboratoire IBN ROCHD Ghardaïa. L'absence d'antigène de l'Hépatite B (HBs), d'anticorps anti-virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et d'anticorps anti-virus de l'hépatite C (VHC) est vérifiée. Ainsi, la formule numération sanguine (FNS) est réalisée.

**Tableau 07-** Position systématique et usages thérapeutiques des espèces de plantes spontanées à caractère médicinal choisies dans la région de Ghardaïa (Ozenda, 1977 ; Voisin, 1987 ; Iserin, 2001 ; Boual, 2014 ; Zhao *et al*., 2014 ; Samout *et al*. 2016)

| Famille | Nom scientifique | Nom Mzab/Arabe | Vivace/ éphémère | Source | Partie utilisée | Mode d'utilisation | Indications traditionnelles |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Plantaginaceae | *Plantago albicans* | Looqmet el na'gy | Éphémère | Sahara septentrional | Graines | Poudre | Immunomodulatrice, Anti-obésité, Anti-oxydante. |
| Plantaginaceae | *Plantago notata* | Adan / Inim | Éphémère | Sahara septentrional | Graines | Poudre | Cicatrisation, Anti-inflammatoire, Constipations. |

## II.3.- Méthodologie d'étude

### II.3.1.- Activité anti-inflammatoire

L'étude *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire de polysaccharides est basée sur la détermination de leurs pouvoirs d'inhibition de l'activité oxydative de la NADPH oxydase d'une part ; d'une autre part d'inhiber l'activité peroxydasique de la MPO.

#### II.3.1.1.- Préparation des extraits de polysaccharides

Les concentrations des polysaccharides sont préparées à partir d'une solution mère de concentration de 100µg/ml (voir tableau 08).

**Tableau 08-** Méthode de dilution de polysaccharides des plantes (A : PSPn ; B : PSPc)

| Concentration (µg/ml) | | 100 | 75 | 50 | 25 | 10 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | **Solution mère (µl)** | 1000 | 750 | 500 | 250 | 100 | 50 |
| | **PBS[1] (µl)** | 0 | 250 | 500 | 750 | 900 | 950 |
| **B** | **Solution mère (µl)** | 1000 | 750 | 500 | 250 | 100 | 50 |
| | **PBS[1] (µl)** | 0 | 250 | 500 | 750 | 900 | 950 |

#### II.3.1.2.- Isolement des neutrophiles humains

Les neutrophiles ont été isolés dans des conditions stériles selon la méthode décrite par Carlson et Kaneko (1973) avec quelques modifications (figure 14).

1. Prélever 20ml de sang dans des tubes citratés ;
2. Distribuer 2ml de sang dans des tubes secs ;
3. Centrifuger pendant 15 min à 1000 g ; puis jeter le surnageant ;
4. Provoquer la lyse en ajoutant d'eau distillée stérile (4ml dans chaque tube) ;
5. Mélanger doucement pendant 30 s ;
6. Ajouter 2ml de PBS1 à 1.8 % NaCl ;
7. Centrifuger pendant 5 min à 300 g ;
8. Jeter le surnageant ;
9. Refaire la lyse en ajoutant d'eau distillée stérile (4ml dans chaque tube) ;
10. Récupérer le culot résultant de PMN dans un nouveau tube ;
11. Laver deux fois avec 4ml de PBS1 (pH 7,4) ;
12. Mettre en suspension dans 1ml HBSS2.

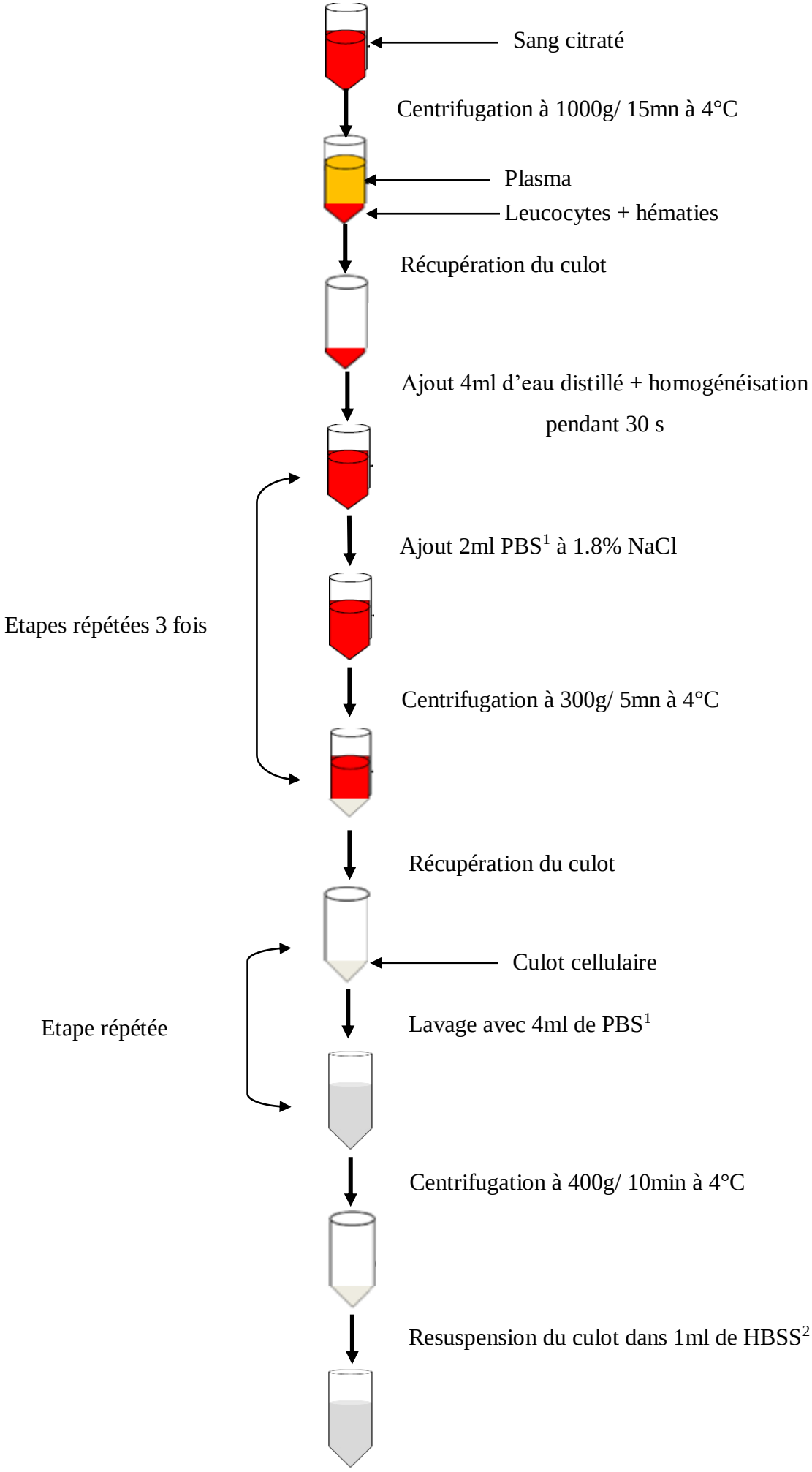


**Figure 14** : Schéma représente les principales étapes d'isolement des neutrophiles à partir du sang humain

### II.3.1.3.- Mesure de l'activité de la NADPH oxydase

#### II.3.1.3.1.- Principe du test

Dans le but d'investiguer l'effet des extraits polysaccharidiques étudiés sur la production du superoxyde par le système NADPH oxydase des PMNs, une méthode colorémértique basée sur la réduction du ferricytochrome C (FC) en ferrocytochrome C par l'anion superoxyde est utilisée. L'activation des PMNs par le PMA déclanche l'activité de NADPH oxydase et par conséquence la libèration des quantités importantes d'$O_2^{\cdot -}$ (Wanikiat *et al.*, 2008 ; Boudoukha, 2018).

Les anions $O_2^{\cdot -}$ ainsi libérées ont la capacité à réduire le $Fe^{3+}$ en $Fe^{2+}$ et donc la réduction du ferricytochrome C en ferrocytochrome C. selon la réaction suivante :

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

Cette réaction s'accompagne d'un changement de coloration du FC qui est détecté à la longueur d'onde 550 nm par un Spectrophotomètre.

Suite à la réduction de cytochrome C le pourcentage d'inhibition de l'activité de la NADPH oxydase phagocytaire est calculé. Après incubation des PMNs avec les extraits polysaccharidiques et activation par le PMA, le ferricytochrome C est ajouté. L'effet inhibiteur des polysaccharides est évalué par diminution de la DO de coloration résultante (Dikalov et Harrison, 2014 ; Boudoukha, 2018).

#### II.3.1.3.2.- Procédure du test

Le test a été réalisé selon la méthode adaptée par Cohen et Chovaniec (1978) avec quelques modifications.

1. Incuber 400µl des cellules ($6 \times 10^6$cellules/ml) avec 100µl de l'extrait polysaccharidique (5–100 µg/ml), ou avec 100µl de l'indométacine pour le contrôle positif ou avec 100µl de PBS[1] pour le contrôle négatif pendant 10 min à 37°C ;
2. Stimuler avec 100µl du PMA ; puis incuber pendant 10 min à 37°C ;
3. Ajouter au mélange 100µl de cytochrome C (0.2 mg/mL)
4. Incuber le mélange réactionnel pendant 15 min à 37°C ;
5. Centrifuger pendant 5 min à 400 g et à 4°C;
6. Mesurer l'Absorbance de surnageant par Spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm.

Les volumes des polysaccharides, de suspension cellulaire, d'indométacine et du PMA utilisés dans ce test sont résumés dans le tableau 09.

**Tableau 09**- Mesure de l'activité de la NADPH oxydase

| Concentrations | | 100 µg/ml | 75 µg/ml | 50 µg/ml | 25 µg/ml | 10 µg/ml | 5 µg/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contrôle positif | Suspenssion cellulaire (µl) | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl |
| | Indométacine (µl) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| | PMA (µl) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| *Plantago notata* | Suspenssion cellulaire (µl) | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl |
| | Polysaccharides (µl) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| | PMA (µl) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| *Plantago albicans* | Suspenssion cellulaire (µl) | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl |
| | Polysaccharides (µl) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| | PMA (µl) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |

**II.3.1.3.3.- Expression du test**

Le pourcentage (**%**) d'inhibition de la NADPH oxydase est calculé selon l'équation suivante :

$$\textbf{\% d'inhibition} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

- $A_0$: Absorbance de contrôle négatif.
- $A_1$ : Absorbance de l'échantillon à doser (Hromádková *et al*., 2013).

**II.3.1.4.- Mesure de l'activité de la MPO**

**II.3.1.4.1.- Principe du test**

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des polysaccharides porte sur la détermination de leur pouvoir inhibiteur sur l'activité de la MPO, qui est un marqueur spécifique des neutrophiles présents dans les granules azurophiles des cellules activées. L'analyse est basée sur des techniques spectrophotométriques utilisent couramment des chromophores tels que la 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), le guaïacol (2-méthoxyphénol) ou l'O-dianisidine, qui vont être oxydé par la MPO en produits colorés 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine diimine, tetra guaïacol, l'O-dianisidine oxydé respectivement (Haqqani *et al*., 1999).

Une modification est apportée à la technique, par l'utilisation d'un nouveau chromophore plus performant, le 4amino-antipyrine. L'oxydation de 4amino-antipyrine par la MPO en présence de phénol et de $H_2O_2$, donne le Quinone imine, indicateur colorimétrique qui absorbe à 546 nm. En présence d'inhibiteur, l'activité enzymatique de la MPO diminue ou inhibé (Xia *et al*., 1997 ; Barham et Trinder, 1999).

**II.3.1.4.2.- Procédure du test**

Le dosage de la MPO a été réalisé suivant la procédure décrite par Kurutas *et al.* (2005) et Meziti (2018) avec légères modifications.

1. Incuber 175 µl des cellules ($6 \times 10^6$cellules/ml) avec 30µl de l'extrait polysaccharidique (5–100µg/ml), ou avec 30µl du diclofénac pour le contrôle positif ou avec 30µl de PBS[1] pour le contrôle négatif pendant 10 min à 37°C ;
2. Stimuler avec 25µl du PMA pendant 10 min à 37°C ;
3. Centrifuger à 320g pendant 10 min à 4°C ;
4. Incuber les surnageants avec le mélange réactionnel 25µl de 4-aminoantipyrine dans un PBS[2] à 0.1 M (pH = 6.0) additionné de 100µl $H_2O_2$ à 0.003% ;

5. La réaction est terminée au bout de 5 min par l'addition de 50µl de $H_2SO_4$ 4M ;
6. Mesurer l'Absorbance par Spectrophotomètre à une longueur d'onde de 546 nm.

Les volumes des polysaccharides, de suspension cellulaire, du diclofénac et du PMA utilisés dans ce test sont résumés dans le tableau 10.

**II.3.1.4.3.- Expression du test**

Le pourcentage d'inhibition de la MPO est calculé selon l'équation suivante :

$$\textbf{\% d'inhibition} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

- $A_0$: Absorbance de contrôle négatif.
- $A_1$ : Absorbance de l'échantillon à doser (Hromádková *et al*., 2013).

Les étapes du test mesure de l'activité de la NADPH oxydase et du test de mesure de l'activité de la MPO sont consignés dans les figures 15 et 16 respectivement.

**Tableau 10-** Mesure de l'activité de la MPO

| Concentrations | | 100 µg/ml | 75 µg/ml | 50 µg/ml | 25 µg/ml | 10 µg/ml | 5 µg/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Contrôle positif | Suspenssion cellulaire (µl) | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl |
| | Diclofénac (µl) | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl |
| | PMA (µl) | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl |
| *Plantago notata* | Suspenssion cellulaire (µl) | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl |
| | Polysaccharides (µl) | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl |
| | PMA (µl) | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl |
| *Plantago albicans* | Suspenssion cellulaire (µl) | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl | 175 µl |
| | Polysaccharides (µl) | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 30 µl |
| | PMA (µl) | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl |

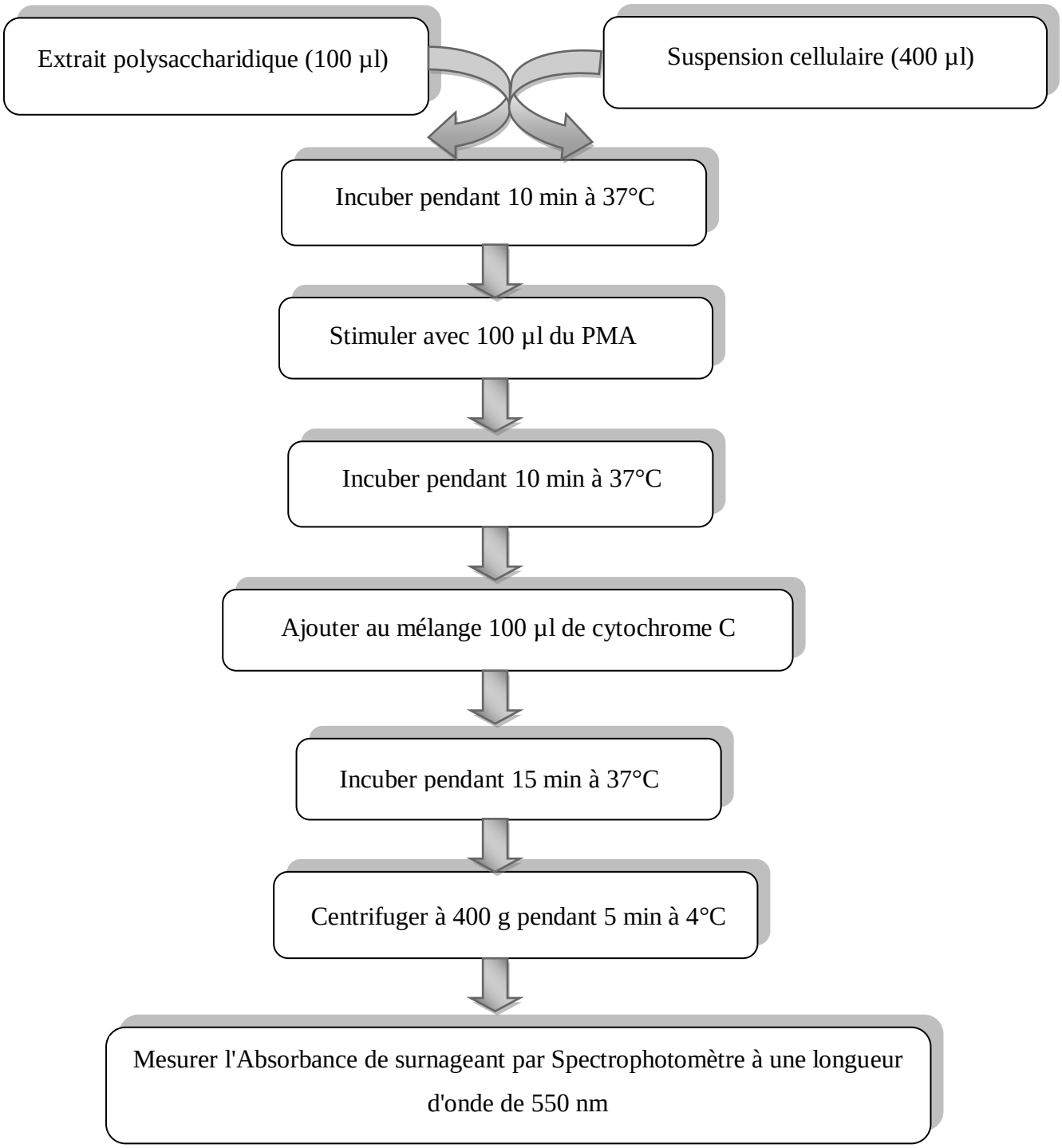


**Figure 15 :** Schéma représente les étapes de mesure de l'activité de la NADPH oxydase

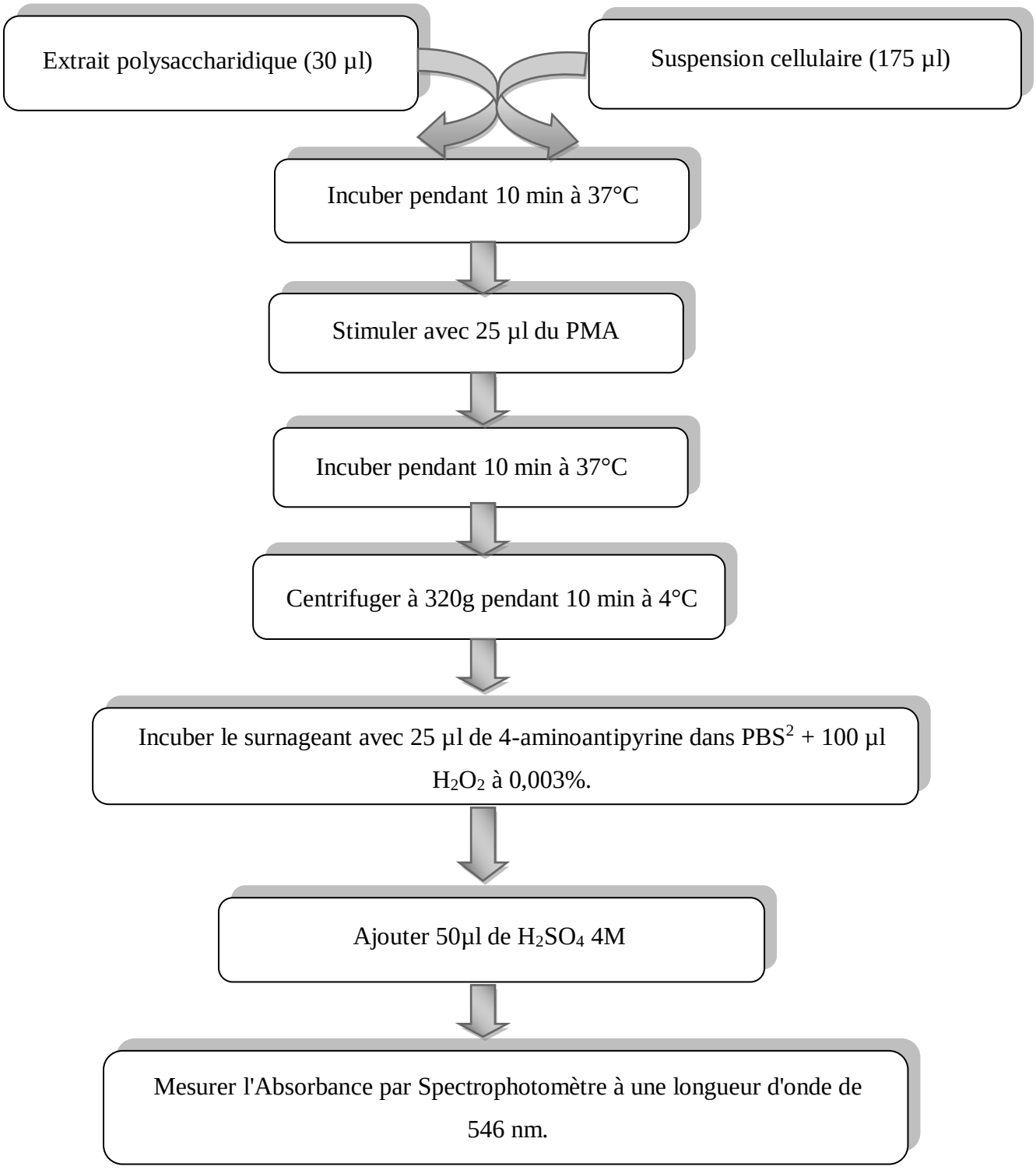


**Figure 16-** Schéma représente les étapes de mesure de l'activité de la MPO

# *Chapitre III*
# *Résultats et discussions*

### III.1.- Isolement des neutrophiles

Après questionnaire effectué avec les patients et confirmation de l'absence de la prise des médicaments anti-inflammatoires dans leurs habitudes ; et après vérification de l'âge, de sexe et l'absence d'antigène HBs, d'anticorps anti-VIH et d'anticorps anti-VHC, les patients ayant une FNS normale, avec un nombre des globules blancs varient de 6 x $10^6$/ml à 10 x $10^6$/ml ont été choisie.

Après isolement des neutrophiles et calcule de nombre du PMNs, laisse remarqué un nombre de cellules d'environ 6 millions par ml. Au vue les études antérieures qui montre une concentration cellulaire varie de 2 à 10 x$10^6$/ml (Buchta, 1990 ; Karnouf, 2010).

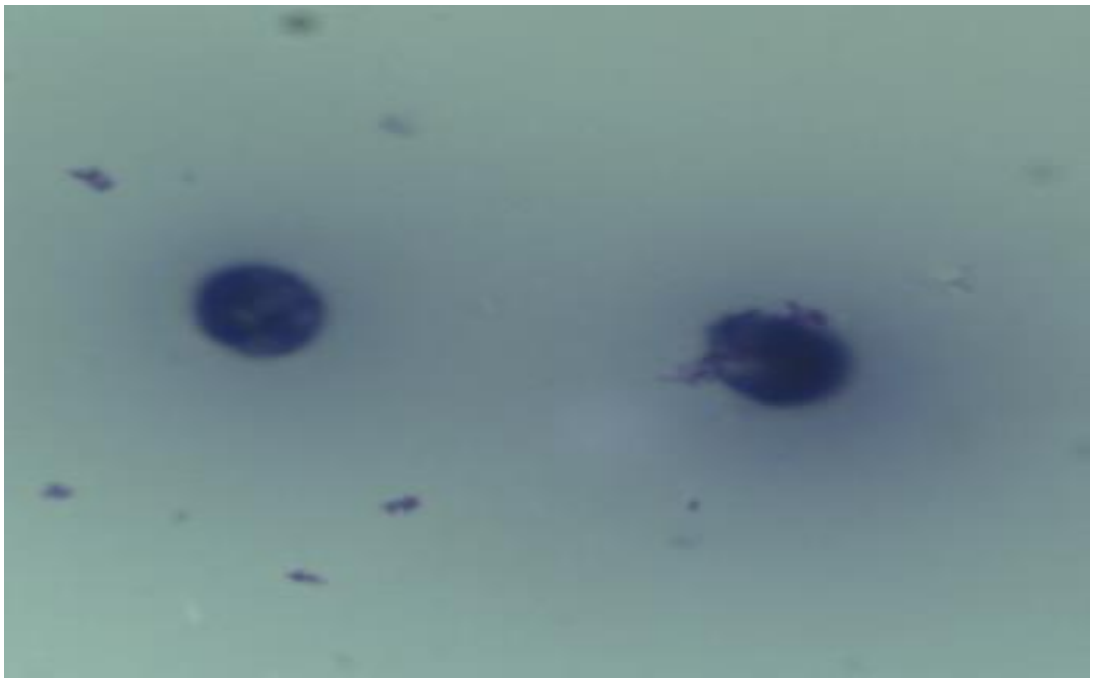

**Photo 01** - Observation microscopique des neutrophiles isolés à partir de sang humains (x1000) (Photo Originale)

### III.2.- Effet des polysaccharides sur l'activité de la NADPH oxydase

Afin d'explorer le mécanisme anti-inflammatoire des extraits de *Plantago notata* et de *Plantago albicans* sur la production de $O_2^{\bullet -}$, les neutrophiles stimulés par le PMA ont été utilisées. La figure 17 présente les pourcentages d'inhibition de l'activité enzymatique de la NADPH oxydase en présence de l'indométacine ou de l'extrait polysaccharidique. Les extraits polysaccharidiques PSPc et PSPn engendrent une amélioration d'inhibition de la NADPH oxydase comparativement à l'indométacine, le contrôle positif. L'allure générale des deux graphes montre une similitude des pourcentages d'inhibition et de manière dose dépendante allant de 21.52% chez PSPn à 5µg/ml jusqu'à 63.08% chez PSPn à 100µg/ml. La production des

$O_2^{\bullet -}$ par les neutrophiles humains est stimulé par le PMA, un agoniste de PKC. A des faibles concentrations de 5µg/ml est remarqué une inhibition aux alentour de 20% pour le PSPc (23.47%) et le PSPn (21.52%). Puis, à 25 et 50µg/ml, il est remarqué une légère amélioration d'inhibition allant de 37.16% à 42.79%. Au regard du PSPn à 75 et à 100µg/ml, il est noté une progression intense d'inhibition, par rapport à le PSPc, et atteindre 63.08%. Alors que à 75 et à 100µg/ml du PSPc, les pourcentages d'inhibition reste stable et atteindre une valeur de 49.39%. Le contrôle positif, l'indométacine, a un fort pouvoir inhibiteur de 83.37% pour une concentration de 100µg/ml, tandis qu'à faible concentration de 5µg/ml, il est remarqué une inhibition de 60.64%. Wanikiat *et al*. (2008) montrent 100% d'inhibition à une concentration de 100µg/ml et 60% d'inhibition à 10µg/ml qui semble plus proche de celle de la présente étude qui montre une inhibition de 62.1% à 10µg/ml.

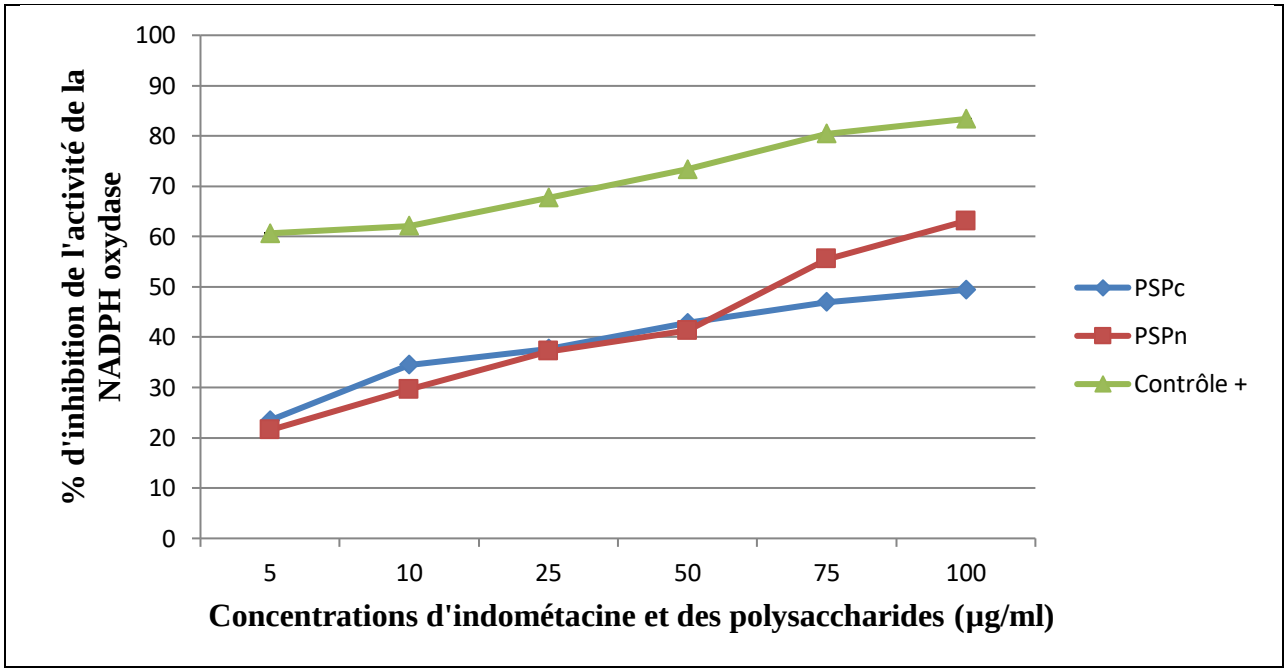


**Figure 17-** Pourcentage d'inhibition de la NADPH oxydase en présence du l'indométacine ou du l'extrait polysaccharidique

Bylund *et al*. (2006) ont étudié l'effet anti-inflammatoire des exopolysaccharides (EPS) issu de *Burkholderia cenocepacia* sur les neutrophiles, par l'évaluation de l'inhibition de la production des ROS. Dans cette étude une dose de 10µg/ml inhibe 8% la production des ROS, alors que à 100µg/ml est remarqué une inhibition de 25%.

Yue *et al*. (2016) ont évalué l'activité inhibitrice de la fraction polysaccharidique issue de *Bletilla striata* (BSPb) contre le stress oxydative des cellules mésangiales humains. Le prétraitement de la réaction inflammatoire par le BSPb abaisse significativement la production de ROS. A 5, 10, et 20µg/ml les niveaux de ROS sont réduits, avec 31.2%, 32.3%, et 37.0%,

respectivement. L'étude structurale montre que le BSPb principalement est composé de D-Man 1,2 lié et de D-Glc 1,4 lié avec un ratio molaire de 3/1. Le poids moléculaire de BSPb est de 260kDa.

Lai et Liu (2015) ont montré que le traitement des cellules progénitrices endothéliales avec 100µg/ml de polysaccharides d'*Angelica sinensis* (ASP) a considérablement diminué la génération d'$O_2^{\cdot -}$ intracellulaire jusqu'à 57.15%. Alors qu'à une dose minimale de 20µg/ml d'ASP est remarqué une inhibition de 8.57%.

Chen *et al*. (2013) ont montré l'effet de la gélose de faible poids moléculaire (LMAG), de chitosan de faible poids moléculaire (LMCH), sur la production de ROS intracellulaires des fibroblastes dermiques. Le traitement avec LMAG a diminué la production de ROS de 2.86%, 7.14% et 17.14% à des concentrations de 10, 50, 100µg/ml, respectivement. Alors que, LMCH provoque une inhibition de 2.86%, 4.29% et 28.57% la production de ROS à des concentrations de 10, 50, 100µg/ml, respectivement.

L'étude de Jang *et al*. (1999) sur le resveratrol, un hydroxystilbene naturel, isolé de *Veratrum album* ont montré 93% d'inhibition de la production des ROS des neutrophiles stimulés par le zymosan à 100µM de resveratrol, alors qu'à une dose minimale de 12.5µM est remarqué une inhibition de 35%.

Carini *et al*. (2001) ont rapporté que le procyanidins issu de *Vitis vinifera* exerce une action inhibitrice sur l'explosion oxydatif des PMNs activés par le PMA. Les résultats montrent une inhibition de 7.50% à 0.5µM de procyanidins et une inhibition de 79.3% pour une dose de 15µM de procyanidins.

Les résultats obtenus montrent que les extraits polysaccharidiques de *Plantago notata* et *Plantago albicans* peuvent significativement réduire la génération du $O_2^{\cdot -}$ par les PMNs stimulés par le PMA. En conséquence, le PSPn et par le PSPc peuvent moduler de façon significative l'activité de la NADPH oxydase.

Donc, la présence des polysaccharides immunomodulateurs chez *Plantago notata* et *Plantago albicans* peuvent confirmer l'utilité de ces deux plantes en médecine traditionnelle comme des anti-inflammatoires.

Ainsi, Tong *et al*. (2013) et Boukemara *et al*. (2016) ont montré l'effet inhibiteur des polysaccharides végétaux sur l'activité catalytique de la NADPH oxydase.

On suppose que l'effet des polysaccharides sur les fonctions du neutrophile résulterait principalement de l'inhibition de certaines enzymes clé impliquées dans les voies de signalisation des PMNs telles que la PKC et phosphoinositide 3-kinase. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans les fonctions du neutrophile (Forman *et al*., 2002 ; Fox *et al*., 2010 ; Boudoukha, 2018).

Le complexe NADPH oxydase est activé par plusieurs enzymes, elles-mêmes activées à travers différentes stimulants tels que le PMA (Panday *et al*., 2015). L'effet inhibiteur exercé par les polysaccharides étudiés sur la production des $O_2^{\bullet -}$ est probablement dû, à l'inhibition d'une ou de certaines enzymes impliquées dans l'activation du NADPH oxydase ou sur la NADPH oxydase elle-même. Cet effet est attribué à l'inhibition de la voie de la PKC ou celle des MAPKs, enzymes clés dans la transduction du signal cellulaire, ce qui entraîne l'inhibition de la phosphorylation et de la translocation induites par le PMA des sous-unités cytosoliques de la NADPH oxydase (Meziti, 2018).

Boukemara *et al*. (2016) ont rapporté que le polysaccharide isolé d'*Anvillea garcinii* pourrait exercer une forte action anti-inflammatoire en inhibant l'activité de PKC, par conséquence entraîne l'inhibition de la phosphorylation et de la translocation de la sous-unité NADPH oxydase, p47phox. Pour valider d'avantage l'action d'Anv sur la PKC/p47phox, Boukemara *et al*. (2016) ont étudié son effet sur la sérine 328 de la p47phox, qui est l'un des résidus les plus phosphorylés par la PKC. Les résultats obtenus en utilisant des anticorps dirigés contre ce résidu phosphorylé ont montré que le polysaccharide Anv était capable d'inhiber la phosphorylation induite par le PMA de la sérine 328 de p47phox ; ainsi que sa translocation sur la membrane plasmique des neutrophiles.

### III.2.- Effet des polysaccharides sur l'activité de la MPO

La MPO est une enzyme héminique présente à une concentration élevée dans les granules primaires des polynucléaires neutrophiles. Dans les conditions physiologiques, environ 10 à 15% de la MPO se trouve dans le milieu extracellulaire. Hors, lors d'une inflammation incontrôlée qui induit une dégranulation massive des granules primaires des neutrophiles, la MPO peut être excrétée en quantité importante. Dans le liquide extra cellulaire, la MPO peut oxyder une large gamme de molécule biologique et cause des dégâts cellulaires importants (Serteyn *et al*., 2003). La MPO est majoritairement impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires (Nastasijević *et al*., 2012). L'effet inhibiteur des extraits polysaccharides vis à vis de la MPO ouvre de nouvelle stratégie pour la prophylaxie ou le traitement des maladies inflammatoire dans lesquelles elle est incriminée (Meziti, 2018).

Comme indiqués dans la figure 18, les résultats montrent que l'activité de la MPO est significativement inhibé d'une manière concentration-dépendante par les deux extraits de polysaccharides des deux plantes. Toutes les concentrations testées montrent une inhibition significative allant de 20.04% chez PSPn à 5µg/ml jusqu'à 41.31% chez PSPn et 41.01% chez PSPc à 100µg/ml. Bien que, l'effet inhibiteur observé soit inférieur à celui de contrôle positif, le diclofénac, qui montre des pourcentages d'inhibition plus élevé dépasse 50% à faible concentration soit 5µg/ml. Le diclofénac montre une inhibition deux fois plus élevé que les extraits testés. L'amélioration d'inhibition est bien remarquée dans les deux extraits polysaccharidiques, aussi bien chez le PSPc que le PSPn.

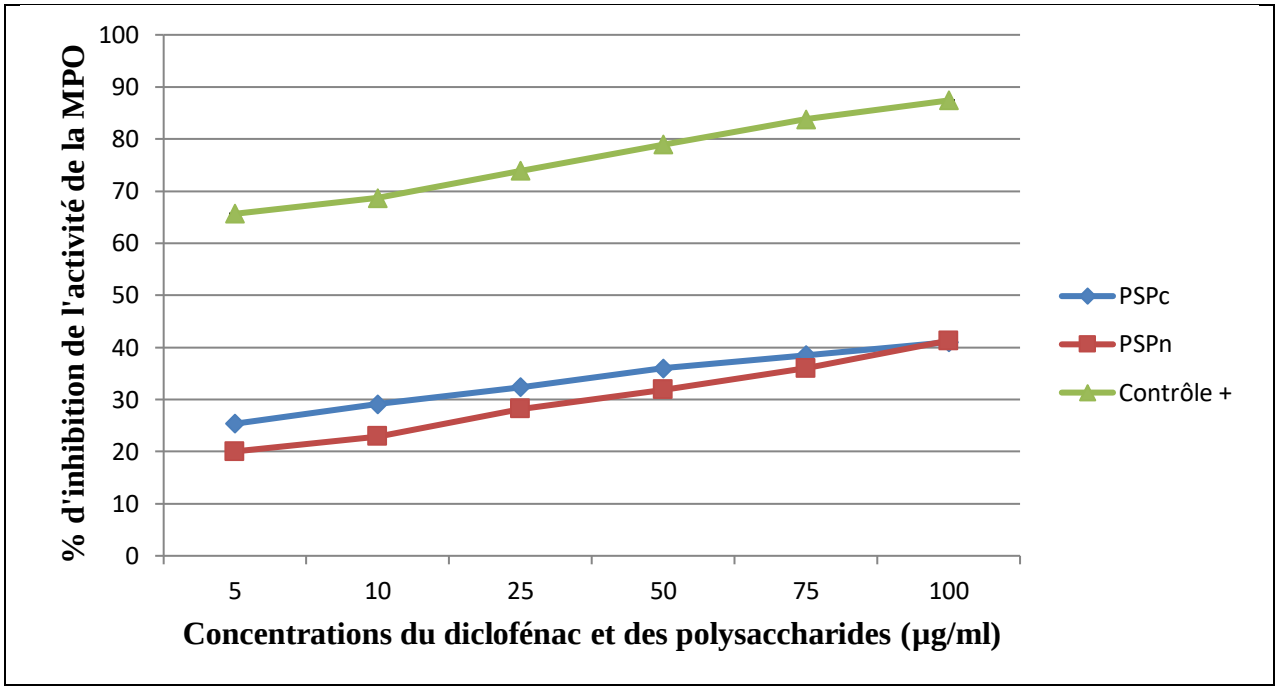


**Figure 18-** Pourcentage d'inhibition de la MPO en présence du diclofénac ou du l'extrait polysaccharidique

Popov *et al*. (1999) ont remarqué que les polysaccharides pectiques issus de *Silene vulgaris* ont un effet inhibiteur sur l'activité de la MPO des neutrophiles. Le polysaccharide pectique isolé montre un pourcentage d'inhibition de 20.51% à 15µg/ml, alors qu'à 150µg/ml l'inhibition atteindre un pourcentage de 54.32%.

Czerwińska *et al*. (2013) ont montré que l'extrait aqueux issu de *Ligustrum vulgare* a une capacité inhibitrice sur l'activité de la MPO des neutrophiles. L'extrait montre un pourcentage d'inhibition de 24.2% à une concentration de 10µg/ml, tandis qu'à 50µg/ml l'inhibition atteindre un pourcentage de 37.4%.

Castro et ses collaborateurs (2014) ont également rapporté une réduction de l'activité de la MPO chez des rats traités par 30 et 60mg/kg de β-glucan issus de champignon *Caripia montagne*. Après induction de l'inflammation par 1% de carrageenan, l'activité de la MPO était 0.2±0.004 et 0.13±0.006U/mg tissue, significativement inferieure a celle des rats non traités soit 0.245 ± 0.001U/mg tissue.

Les résultats obtenus ont montré que les extraits polysaccharidiques de *Plantago notata* et de *Plantago albicans*, représentent un effet inhibiteur significatif sur l'activité de la myéloperoxidase. L'effet exercé par ces substances sur l'activité de la myéloperoxidase des PMNs, indique que les polysaccharides testés ayant un effet anti-inflammatoire.

Ces composés sont probablement impliqués dans la modulation de certaines fonctions effectrices des neutrophiles. En effet, Silva *et al*. (2015), Stipp *et al*. (2017) et Huang *et al*. (2018) ont montré l'effet inhibiteur des polysaccharides végétaux sur l'activité catalytique de la MPO et ils ont mis en évidence une forte corrélation entre la teneur en polysaccharides de plusieurs variétés et leurs activités inhibitrices vis-à-vis de la MPO.

Dans le but d'identifier les groupements potentiels au sein des polysaccharides qui sont responsables de l'effet inhibiteur vis-à-vis de la MPO. Liu *et al.* (2018) ont étudié la relation structure-activité de plusieurs polysaccharides. Des auteurs ont suggérés que les polysaccharides les plus actifs pour réduire l'activité de la MPO sont ceux qui possèdent des monosaccharides suivants : Xyl-Ara-Rha-Glc-GalA-Man-Fuc-Rib (Silva *et al*., 2015 ; Stipp *et al*., 2017 ; Meziti, 2018). La composition en monosaccharides du PSPn après analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse (CPG/SM) a montré la composition suivante: Xyl (77.4%) ; Ara (7.58%) ; Rha (9.20%) ; Glc (1.00) ; GalA (2.58%) ; Man (2.21%) (Benaoun, 2017). Ainsi, les β-glucans jouent un rôle vital dans le maintien des effets anti-inflammatoires (Liu *et al*., 2018).

Les résultats obtenus indiquent que les deux polysaccharides semblent avoir une capacité inhibitrice de la libération de la MPO, ce qui pourrait concourir à réduire la charge des dommages induits par la MPO. Cette capacité inhibitrice pourrait être relative à la composition en monosaccharides (Boudoukha, 2018).

La réduction de l'activité de la MPO peut être interprétée comme un effet anti-inflammatoire du PSPn et du PSPc, en inhibant les fonctions des neutrophiles et en limitant la propagation des ROS aux tissus voisins. Ces données consolident l'utilisation ethno-pharmacologique de *Plantago notata* et de *Plantago albicans* en médecine populaire.

On suppose que les polysaccharides se fixent sur le site actif de la MPO et se comportent comme inhibiteurs compétitifs. Des études complémentaires sur l'interaction entre le polysaccharide et la MPO sont nécessaires pour confirmer cette supposition.

# *Conclusion et perspectives*

Malgré le nombre considérable de recherches publiées sur les polysaccharides extraits de plantes médicinales, la littérature ne rapporte aucune information sur les effets des polysaccharides extraits de deux plantes spontanées au Sahara septentrional algérien *Plantago notata* et *Plantago albicans*, largement utilisées en médecine traditionnelle pour traiter ou soulager plusieurs types de maladies inflammatoires. En ce qui nous concerne, nous avons essayé d'étudier leur effet anti-inflammatoire en analysant leur action sur les fonctions effectrices du neutrophile humain, première cellule qui rejoint le foyer inflammatoire.

La recherche d'alternatifs aux substances chimiques largement utilisées en médecine et qui présentent des risques pour la santé humaine, est le but visé.

Dans cette étude, nous avons isolé d'abord les neutrophiles à partir de sang humains puis, nous avons préparé les extraits polysaccharidiques issus de *Plantago notata* et de *Plantago albicans*. Ensuite, l'effet anti-inflammatoire des deux extraits polysaccharides a été étudié *in vitro* sur les neutrophiles humains stimulés (modèle d'inflammation). Leur effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de la NADPH oxydase et de la MPO a été également évalué, par une méthode colorimétrique. L'activité de la NADPH oxydase, est mesurée on utilisant le ferricytochrome C, alors que pour étudier l'activité de la MPO, on utilisant un nouveau chromophore, la 4-aminoantipyrine, est une nouvelle proposition qu'on a appliquée. Nous avons réussir dans cette proposition.

Les résultats de la présente étude indiquent que les extraits polysaccharidiques peuvent tous deux, moduler l'activité des neutrophiles ce qui nous permet de dire que *Plantago notata* et de *Plantago albicans* possèdent d'importantes propriétés anti-inflammatoires via leurs activités inhibitrices sur le fonctionnement de la NADPH oxydase et de la MPO. L'activité inhibitrice du PSPn et du PSPc obtenus dans la présente étude est importante, par rapport à la littérature. De tels résultats supportent l'usage traditionnel de ces deux plantes dans le soulagement de diverses maladies inflammatoires. *Plantago notata* et *Plantago albicans* pourraient être considérées comme des sources intéressantes d'agents immunomodulateurs avec applications pharmacologiques potentielles dans des pathologies, dans lesquelles une activation inappropriée des neutrophiles est impliquée.

Notre travail a apporté de nouvelles données concernant les propriétés anti-inflammatoires des polysaccharides extraits de *Plantago notata* et *Plantago albicans* et a élucidé une partie de leurs mécanismes d'action. Cependant des études complémentaires approfondies sont nécessaires pour comprendre leurs mécanismes moléculaires en se focalisant sur :

- La détermination le mécanisme inhibiteur du PSPn et du PSPc sur la phosphorylation des sous unités cytosoliques de la NADPH oxydase.
- L'étude de l'interaction entre le polysaccharide et la MPO (structure-site actifs) est nécessaire afin de déterminer l'action inhibitrice de cette biomolécule.
- L'utilisation des différents stimuli des voies de signalisation au sein du neutrophile afin de déterminer les mécanismes par lesquels ces composés agissent.
- L'étude de l'effet des extraits polysaccharidiques sur d'autres fonctions du neutrophile et principalement le chimiotactisme.

# *Références bibliographiques*

1. Abdel-Latif, D., Steward, M., Macdonald, D. L., Francis, G. A., Dinauer, M. C., & Lacy, P. (2004). Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. Blood, 104(3), 832-839.
2. Alton G. G., Carter G. R., Kibor A. C. et Pesti L., 1992- Diagnostic bactériologique vétérinaire méthodes de laboratoire pour le diagnostic de certaines maladies de bétail. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Ed. FAO, Rome : 14-18.
3. Amagase, H., & Farnsworth, N. R. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of Lycium barbarum fruit (Goji). Food research international, 44(7), 1702-1717.
4. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annual review of immunology, 30, 459-489.
5. Angone, S. A., Nguema-Ona, E., & Driouich, A. (2010). La thérapie par les plantes en Afrique: activités immunostimulantes des polysaccharides de la paroi végétale. Phytothérapie, 8(4), 223-230.
6. Ariel, A., & Serhan, C. N. (2012). New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. Frontiers in immunology, 3, 4.
7. Babior B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. Blood., 93(5)., 1464-1476.
8. Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. Archives of biochemistry and biophysics. 397(2): 342-344.
9. Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. The American journal of medicine, 109(1), 33-44.
10. Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. Current opinion in immunology, 16(1), 42-47.
11. Bachoual, R., Talmoudi, W., Boussetta, T., Braut, F., & El-Benna, J. (2011). An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. Food and Chemical Toxicology, 49(6), 1224-1228.
12. Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS letters, 307(1), 97-101.
13. Barham, D., & Trinder, P. (1972). An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. Analyst, 97(1151), 142-145.
14. Batista, J. A., Dias, E. G., Brito, T. V., Prudêncio, R. S., Silva, R. O., Ribeiro, R. A., ... & Melo, M. R. (2014). Polysaccharide isolated from Agardhiella ramosissima: Chemical structure and anti-inflammation activity. Carbohydrate polymers, 99, 59-67.

15. Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiological reviews, 87(1), 245-313.
16. Belambri S. A., 2013.- Etude du mécanisme d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire : Analyse de la dynamique de phosphorylation de la p47phox dans le neutrophile activé.
17. Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., & Younos, C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. Journal of ethnopharmacology, 35(2), 123-143.
18. Benaoun, F. (2017). Caractérisation structurale et potentiel biologique des polysaccharides issus de Plantago notata Lagasca (Plantaginaceae) et Urginea noctiflora Batt. Trab (Liliaceae) (Doctoral dissertation, Clermont Auvergne).
19. Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J., & Denkers, E. Y. (2003). Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. The Journal of Immunology, 171(11), 6052-6058.
20. Bertram, A. and Ley, K. (2011). Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis. 59(2),79-87.
21. Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. Science, 304(5673), 1014-1018.
22. Blétry O, Kahn JE, Somogyi A (2006). Immunopathologie, réaction inflammatoire. Paris: Masson. p:405-420.
23. Bokoch, G.M., Zhao, T. (2006) Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. Antioxid Redox Signal 8, 1533-48.
24. Borregaard N (2010). Neutrophils, from marrow to microbs. Immunity, 33, 657-670.
25. Borregaard, N., & Cowland, J. B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood, 89(10), 3503-3521.
26. Botting R.M., Botting J.H. (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. Clinical Drug Investigation. 19: 1-7.
27. Boual, Z. (2014). Caractérisation physico-chimique des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara Septentrional Est algérien): Activité biologique. Thèse de doctorat, Biochimie, Université Kasdi-Merbah de Ouargla, Algérie, 159P.
28. Boudoukha, C. (2018). Etude de certaines fonctions du neutrophile humain et leur modulation par les extraits de Santolina chamaecyparissus (Doctoral dissertation).
29. Boukemara, H. (2016). Effet de deux plantes médicinales Anvillea garcinii et Zygophyllum gaetulum sur le système immunitaire (Doctoral dissertation).

30. Boukemara, H., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Bendjeddou, D., El Benna, J., & Marie, J. C. (2016). Anvillea garcinii extract inhibits the oxidative burst of primary human neutrophils. BMC complementary and alternative medicine, 16(1), 433.
31. Boxio, R. (2005). Signalisation intracellulaire dans la régulation des fonctions bactéricides chez les polynucléaires neutrophiles de souris (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy.
32. Bressan E, Tonussi CR (2008). Antiinflammatory effects of etoricoxib alone and combined with NSAIDs in LPS-induced reactive arthritis. Inflammation Research, 57, 586-592.
33. Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. Nature Reviews Microbiology, 5(8), 577.
34. Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?. J Cell Biol, 198(5), 773-783.
35. Buchta, R. (1990). Functional and biochemical properties of ovine neutrophils. Veterinary immunology and immunopathology, 24(2), 97-112.
36. Bylund, J., Burgess, L. A., Cescutti, P., Ernst, R. K., & Speert, D. P. (2006). Exopolysaccharides from Burkholderia cenocepacia inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. Journal of Biological Chemistry, 281(5), 2526-2532.
37. Carini, M., Stefani, R., Aldini, G., Ozioli, M., & Facino, R. M. (2001). Procyanidins from Vitis vinifera seeds inhibit the respiratory burst of activated human neutrophils and lysosomal enzyme release. Planta medica, 67(08), 714-717.
38. Carlson, G. P., & Kaneko, J. J. (1973). Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 142(3), 853-856.
39. Carman, C. V., & Springer, T. A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. The Journal of cell biology, 167(2), 377-388.
40. Carrichon, L. (2009) Régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire.Mécanismes moléculaires de la super-activité oxydase du cytochrome b558 D-loopNox4-Nox2., in Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant, Université Joseph Fourier Grenoble. p. 181.
41. Caruso RA., Fedele F., Finocchiaro G., & Venuti AA., (2012). Neutrophil-tumor cell phagocytosis (Cannibalism) in human tumors: an update and literature review. Exp Oncol, 34(3), 303-311.

42. Castro, A. J. G., Castro, L. S. E. W., Santos, M. S. N., Faustino, M. G., Pinheiro, T. S., Dore, C. M. G., ... & Leite, E. L. (2014). Anti-inflamatory, anti-angiogenenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi Caripia montagnei. Biomedicine & Preventive Nutrition, 4(2), 121-129.
43. Cazarin, C. B., da Silva, J. K., Colomeu, T. C., Batista, Â. G., Vilella, C. A., Ferreira, A. L., ... & Zollner, R. D. L. (2014). Passiflora edulis peel intake and ulcerative colitis: approaches for prevention and treatment. Experimental Biology and Medicine, 239(5), 542-551.
44. Chakravarti, A., Allaeys, I., & Poubelle, P. E. (2007). Neutrophile et immunité-Est-ce inné ou acquis?. médecine/sciences, 23(10), 862-867.
45. Chang, J. S., Bae, J. T., Oh, E. J., Kim, J. Y., Park, S. H., & Lee, K. R. (2009). Cancer preventive potential of methanol extracts of Hypsizigus marmoreus. Journal of medicinal food, 12(3), 493-500.
46. Chavakis, T., Bierhaus, A., Al-Fakhri, N., Schneider, D., Witte, S., Linn, T., Nagashima, M., Morser, J., Arnold, B., Preissner, K. T., & Nawroth, P. P. (2003). The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. Journal of Experimental Medicine, 198(10), 1507-1515.
47. Chaves, L. D. S., Nicolau, L. A. D., Silva, R. O., Barros, F. C. N., Freitas, A. L. P., Aragão, K. S., ... & Medeiros, J. V. R. (2013). Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae Gracilaria caudata. Immunopharmacology and immunotoxicology, 35(1), 93-100.
48. Chen, S. K., Hsu, C. H., Tsai, M. L., Chen, R. H., & Drummen, G. (2013). Inhibition of oxidative stress by low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups in skin fibroblasts. International journal of molecular sciences, 14(10), 19399-19415.
49. Chen, Y. A., & Scheller, R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. Nature reviews Molecular cell biology, 2(2), 98.
50. Chiang, L. C., Chiang, W., Chang, M. Y., & Lin, C. C. (2003). In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of Plantago major and Plantago asiatica. The American journal of Chinese medicine, 31(02), 225-234.
51. Choi, E. Y., Santoso, S., & Chavakis, T. (2009). Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 14, 1596.
52. Cohen, H. J., & Chovaniec, M. E. (1978). Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. A basis for a continuous assay for monitoring superoxide

production and for the study of the activation of the generating system. The Journal of clinical investigation, 61(4), 1081-1087.

53. Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. Immunological reviews, 273(1), 11-28.
54. Cox, J.A., Jeng, A.Y., Sharkey, N.A., Blumberg, P.M., Tauber, A.I. (1985) Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. J Clin Invest 76, 1932-8.
55. Cross, A. R., & Segal, A. W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1657(1), 1-22.
56. Cross, A.R., Erickson, R.W., Curnutte, J.T. (1999) Simultaneous presence of p47(phox) and flavocytochrome b-245 are required for the activation of NADPH oxidase by anionic amphiphiles. Evidence for an intermediate state of oxidase activation. J Biol Chem 274, 15519-25.
57. Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D'incecco, A., Piccoli, A., Totani, L. & Usov, A. I. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. Glycobiology, 17(5), 541-552.
58. Czerwińska, M. E., Granica, S., & Kiss, A. K. (2013). Effects of an aqueous extract from leaves of Ligustrum vulgare on mediators of inflammation in a human neutrophils model. Planta medica, 79(11), 924-932.
59. Dale, D. C., Boxer, L., & Liles, W. C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. Blood, 112(4), 935-945
60. Derochette, S. (2015). L'activité de la NADPH oxydase: une nouvelle cible pour la curcumine? (Doctoral dissertation, Université de Liège, Liège, Belgique).
61. Dikalov, S. I., & Harrison, D. G. (2014). Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. Antioxidants & redox signaling, 20(2), 372-382.
62. Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood, 87(6), 2095-2147.
63. Doussiere, J., Gaillard, J., Vignais, P.V. (1996) Electron transfer across the O2-generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. Biochemistry 35, 13400-10.
64. Driscoll, K. E. (2000). TNFα and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. Toxicology letters, 112, 177-183.

65. Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews. 82(1): 47-95.
66. Duan, C. L., Qiao, S. Y., Wang, N. L., Zhao, Y. M., Qi, C. H., & Yao, X. S. (2001). Studies on the active polysaccharides from Lycium barbarum L. Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica, 36(3), 196-199.
67. Eddy, R. J., Pierini, L. M., Matsumura, F., & Maxfield, F. R. (2000). $Ca^{2+}$-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. J Cell Sci, 113(7), 1287-1298.
68. El Benna J., Dang P.M.C., Gougerot-Pocidalo M.A., Elbim C. (2005). Phagocyte NAPH oxidase a multicomponent enzyme essential for host defenses. Arch Immunol Ther Exp. 53: 199-206.
69. El Benna J., Dang P.M.C., Gougerot-Pocidalo M.A., Marie J.C., Braut-Boucher F. (2009). P47phox., the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: Structure., phosphorylation and implication in diseases. Exp Mol Med. 41: 217-225.
70. El Benna J., Dang P.M.C., Périanin A. (2010). Peptide-based inhibitors of phagocyte NADPH oxidase. Biochem Pharmacol. 80: 778-785.
71. El Benna J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Marie J.C., Gougerot-Pocidalo M.A.,Dang P.M (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. Immunol Rev. 273(1): 180-93.
72. El Benna, J., Dang, P.M., and Gougerot-Pocidalo, M.A. (2008) Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. Seminars in Immunopathology. 30(3),279-289.
73. El kebir D and Filep JG. (2013). Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through β2-integrins. Front in mmunol, 4, 1-15.
74. Ellis, V., & Murphy, G. (2001). Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. FEBS letters, 506(1), 1-5.
75. Ethuin, F., Gérard, B., Benna, J. E., Boutten, A., Gougereot-Pocidalo, M. A., Jacob, L., & Chollet-Martin, S. (2004). Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. Laboratory investigation, 84(10), 1363.
76. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. The Journal of clinical investigation, 101(4), 890-898.
77. Faurschou, M, Borregaard N (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes and Infection, 5, 1317-1327. Feline Gastroenterology. p:463-70.

78. Forman, H. J., & Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. American journal of respiratory and critical care medicine, 166(supplement_1), S4-S8.
79. Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C., & Rossi, A. G. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. Journal of innate immunity, 2(3), 216-227.
80. Funk, J. L., Frye, J. B., Oyarzo, J. N., & Timmermann, B. N. (2009). Comparative effects of two gingerol-containing Zingiber officinale extracts on experimental rheumatoid arthritis. Journal of natural products, 72(3), 403-407.
81. Funk, J. L., Oyarzo, J. N., Frye, J. B., Chen, G., Lantz, R. C., Jolad, S. D., ... & Timmermann, B. N. (2006). Turmeric extracts containing curcuminoids prevent experimental rheumatoid arthritis. Journal of natural products, 69(3), 351-355.
82. Furtmüller, P. G., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., Obinger, C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases.Archives of biochemisty and biophysics,445(2):199-213.
83. Galijasevic, S. (2018). The development of myeloperoxidase inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters.
84. Gambardella, L., & Vermeren, S. (2013). Molecular players in neutrophil chemotaxis—focus on PI3K and small GTPases. Journal of leukocyte biology, 94(4), 603-612.
85. Gao, Z., Li, J., Song, X., Zhang, J., Wang, X., Jing, H., ... & Jia, L. (2017). Antioxidative, anti-inflammation and lung-protective effects of mycelia selenium polysaccharides from Oudemansiella radicata. International journal of biological macromolecules, 104, 1158-1164.
86. Gerke, V., & Moss, S. E. (2002). Annexins: from structure to function. Physiological reviews, 82(2), 331-371.
87. Gougerot-Pocidalo MA (2012). The neutrophil and systemic inflammation. Joint Bone Spine, 79(3), 209-211.
88. Gougerot-Pocidalo M-A, Halbwachs-Mecarelli L (2005). L'activation du polynucléaire neutrophile dans la synovite rhumatoïde. Revue du Rhumatisme, 72, 303-309.
89. Greenberg S, Grinstein S (2002). Phagocytosis and innate immunity, Current Opinion in Immunology, 14, 136-145.
90. Groemping, Y., & Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. Biochemical Journal, 386(3), 401-416.

91. Gupta, M., Mazumder, U. K., Gomathi, P., & Selvan, V. T. (2006). Antiinflammatory evaluation of leaves of Plumeria acuminata. BMC Complementary and alternative medicine, 6(1), 36.
92. Häger, M., Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2010). Neutrophil granules in health and disease. Journal of internal medicine, 268(1), 25-34.
93. Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood, 92(9), 3007-3017.
94. Hanks, J. H. (1975). Hanks' balanced salt solution and pH control. Methods in Cell Science, 1(1), 3-4.
95. Haqqani, A. S., Sandhu, J. K., & Birnboim, H. C. (1999). A myeloperoxidase-specific assay based upon bromide-dependent chemiluminescence of luminol. Analytical biochemistry, 273(1), 126-132.
96. Henzen C (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. Forum Médical Suisse, 19, 442-446
97. Hirai, H., Zhang, P., Dayaram, T., Hetherington, C. J., Mizuno, S. I., Imanishi, J.,Akashi, K., & Tenen, D. G. (2006). C/EBPβ is requiredfor'emergency'granulopoiesis.Nature immunology, 7(7), 732.
98. Hoesel L.M., Neff T.A., Neff S.B., Younger J.G., Olle E.W., Gao H., Pianko M.J., Bernacki K.D., Sarma J.V., Ward P.A. (2005). Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. Shock. 24(1): 40-47.
99. Hoy, A., Leininger-Muller, B., Kutter, D., Siest, G., & Visvikis, S. (2002). Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. Clinical chemistry and laboratory medicine, 40(1), 2-8.
100. Hromádková, Z., Paulsen, B. S., Polovka, M., Košťálová, Z., & Ebringerová, A. (2013). Structural features of two heteroxylan polysaccharide fractions from wheat bran with anti-complementary and antioxidant activities. Carbohydrate polymers, 93(1), 22-30.
101. Huang, D., Xia, Q., Li, F., Yang, W., Nie, S., & Xie, M. (2018). Attenuation of intestinal inflammation of polysaccharides from the seeds of Plantago asiatica L. as affected by ultrasonication. Journal of Food Biochemistry, 42(6), e12656.
102. Hurtado-Nedelec, M., Dang, P. M. C., Monteiro, R. C., El Benna, J., & Gougerot-Pocidalo, M. A. (2014). Physiologie des polynucléaires neutrophiles humains. Revue Francophone des Laboratoires, 2014(462), 25-38.
103. Hwang, T. L., Leu, Y. L., Kao, S. H., Tang, M. C., & Chang, H. L. (2006). Viscolin, a new chalcone from Viscum coloratum, inhibits human neutrophil superoxide anion and

elastase release via a cAMP-dependent pathway. Free Radical Biology and Medicine, 41(9), 1433-1441.

104. Iserin, P. (2001). Encyclopedia of Medicinal Plants (2nd Edition).
105. Iwata, M., Suzuki, S., Asai, Y., Inoue, T., & Takagi, K. (2010). Involvement of nitric oxide in a rat model of carrageenin-induced pleurisy. Mediators of inflammation, 2010.
106. Jamila, F., & Mostafa, E. (2014). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. Journal of ethnopharmacology, 154(1), 76-87.
107. Jang, D. S., Kang, B. S., Ryu, S. Y., Chang, I. M., Min, K. R., & Kim, Y. (1999). Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. Biochemical pharmacology, 57(6), 705-712.
108. Jiang, W., Luo, F., Lu, Q., Liu, J., Li, P., Wang, X., ... & Ding, X. (2016). The protective effect of Trillin LPS-induced acute lung injury by the regulations of inflammation and oxidative state. Chemico-biological interactions, 243, 127-134.
109. Jing, Y., Zhu, J., Liu, T., Bi, S., Hu, X., Chen, Z., ... & Yu, R. (2015). Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from cultured Cordyceps militaris and its sulfated derivative. Journal of agricultural and food chemistry, 63(13), 3464-3471.
110. Jungbluth, G. (2008). Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la physiopathologie canine (Doctoral dissertation), 1: 1- 35
111. Kaji, T., Okabe, M., Shimada, S., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Lee, J. B., & Hayashi, T. (2004). Sodium spirulan as a potent inhibitor of arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. Life sciences, 74(19), 2431-2439.
112. Kang, T., Yi, J., Guo, A., Wang, X., Overall, C. M., Jiang, W., Elde, R., Borregaard, N., & Pei, D. (2001). Subcellular distribution and cytokine-and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. Journal of Biological Chemistry, 276(24), 21960-21968.
113. Kang, Y., Xue, Y., Du, M., & Zhu, M. J. (2017). Preventive effects of Goji berry on dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice. The Journal of nutritional biochemistry, 40, 70-76.
114. Kantari C., Pederzoli-Ribeil M., Witko-sarsat V. (2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immuty. Trends in Innate Immunity. 15: 118-146.
115. Kaplan, M. J., & Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. The Journal of Immunology, 189(6), 2689-2695.

116. Karlsson, A., & Dahlgren, C. (2002). Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. Antioxidants and Redox Signaling, 4(1), 49-60.
117. Karnouf N., 2010.- Effet des extraits de Capparis spinosa L. sur la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles humains.
118. Kasahara, Y., Iwai, K., Yachie, A., Ohta, K., Konno, A., Seki, H., Miyawaki, T. & Taniguchi, N. (1997). Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)–mediated apoptosis of neutrophils. Blood, 89(5), 1748-1753.
119. Kelly M, Hwang JM, Kubes P (2007). Modulating leukocyte recruitment in Inflammation. Current Reviews of Allergy and Clinical Immunology,120, 3-10.
120. Kennedy, A. D., & DeLeo, F. R. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. Immunologic research, 43(1-3), 25-61.
121. Kessel L, Tendal B, Jorgensen KJ, Erngaard D, Flesner P, Andresen JL, Hjortdal J (2014). Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops. Ophthalmol. 121:1915-1924.
122. Kirassian C., 2015.- Le cassis et la reine des pres : deux plantes aux proprietes anti-inflammatoires.
123. Klebanoff, S. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. Journal of Leucocyte Biology. 77,598-625.
124. Klebanoff, S. J. (1999). Myeloperoxidase. Proceedings of the Association of American Physicians, 111(5), 383-389.
125. Klenchin, V. A., & Martin, T. F. (2000). Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. Biochimie, 82(5), 399-407.
126. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Burlak C., DeLeo F.R. (2005). Neutrophils in the innate immune response. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 53(6): 505-517.
127. Koenig, J. M., Bliss, J. M., & Mariscalco, M. M. (2017). Normal and Abnormal Neutrophil Physiology in the Newborn. In Fetal and Neonatal Physiology (pp. 1216-1229). Elsevier.
128. Koko, W. S., Mesaik, M. A., Yousaf, S., Galal, M., & Choudhary, M. I. (2008). In vitro immunomodulating properties of selected Sudanese medicinal plants. Journal of ethnopharmacology, 118(1), 26-34.
129. Kolaczkowska E., Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature reviews. Immunology. 13(3): 159-175.
130. Kumar, V., & Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. International immunopharmacology, 10(11), 1325-1334.

131. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2014). Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book. Elsevier health sciences.
132. Kurutas, E. B., Cetinkaya, A., Bulbuloglu, E., & Kantarceken, B. (2005). Effects of antioxidant therapy on leukocyte myeloperoxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase and plasma malondialdehyde levels in experimental colitis. Mediators of inflammation, 2005(6), 390-394.
133. Kusaykin, M., Bakunina, I., Sova, V., Ermakova, S., Kuznetsova, T., Besednova, N., ... & Zvyagintseva, T. (2008). Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology, 3(7), 904-915.
134. Kwong, C.H., Malech, H.L., Rotrosen, D., Leto, T.L. (1993) Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. Biochemistry 32, 5711-7.
135. Lai, P., & Liu, Y. (2015). Angelica sinensis polysaccharides inhibit endothelial progenitor cell senescence through the reduction of oxidative stress and activation of the Akt/hTERT pathway. Pharmaceutical biology, 53(12), 1842-1849.
136. Lakhani S, Dilly S A, Finlayson CA (2009). Basic pathology: an introduction to the mechanisms of disease. London: Hodder. p:25-40.
137. Lapouge, K., Smith, S. J., Groemping, Y., & Rittinger, K. (2002). Architecture of the p40-p47-p67 phox Complex in the Resting State of the NADPH Oxidase A CENTRAL ROLE FOR p67 phox. Journal of Biological Chemistry, 277(12), 10121-10128.
138. Li, J., Guillory, R.J. (1997) Purified leukocyte cytochrome b558 incorporated into liposomes catalyzes a cytosolic factor dependent diaphorase activity. Biochemistry 36, 5529-37.
139. Li, W., Yao, H., Niu, X., Wang, Y., Zhang, H., Li, H., Mu, Q. (2015c). Protective effect of δ-amyrone against ethanol-induced gastric ulcer in mice. Immunobiology, 220(6): 798-806.
140. Li, X. J., & Ye, Q. F. (2015b). Fucoidan reduces inflammatory response in a rat model of hepatic ischemia–reperfusion injury. Canadian journal of physiology and pharmacology, 93(11), 999-1005.
141. Li, X. J., Mu, Y. M., Li, T. T., Yang, Y. L., Zhang, M. T., Li, Y. S., ... & Shang, H. C. (2015a). Gynura procumbens reverses acute and chronic ethanol-induced liver steatosis through MAPK/SREBP-1c-dependent and-independent pathways. Journal of agricultural and food chemistry, 63(38), 8460-8471.
142. Ligeti, E., & Mócsai, A. (1999). Exocytosis of neutrophil granulocytes. Biochemical pharmacology , 57(11), 1209-1214.

143. Lin, C. C., & Kan, W. S. (1990). Medicinal plants used for the treatment of hepatitis in Taiwan. The American journal of Chinese medicine, 18(01n02), 35-43.
144. Lithander, A. (1992). Intracellular fluid of waybread (Plantago major) as a prophylactic for mammary cancer in mice. Tumor Biology, 13(3), 138-141.
145. Liu, M., Yao, W., Zhu, Y., Liu, H., Zhang, J., & Jia, L. (2018). Characterization, antioxidant and antiinflammation of mycelia selenium polysaccharides from Hypsizygus marmoreus SK-03. Carbohydrate polymers, 201, 566-574.
146. Liu, Q., Tian, G., Yan, H., Geng, X., Cao, Q., Wang, H., & Ng, T. B. (2014). Characterization of polysaccharides with antioxidant and hepatoprotective activities from the wild edible mushroom Russula vinosa Lindblad. Journal of agricultural and food chemistry, 62(35), 8858-8866.
147. Lu, Z. M., Tao, W. Y., Xu, H. Y., Ao, Z. H., Zhang, X. M., & Xu, Z. H. (2011). Further studies on the hepatoprotective effect of Antrodia camphorata in submerged culture on ethanol-induced acute liver injury in rats. Natural product research, 25(7), 684-695.
148. Maianski, N. A., Maianski, A. N., Kuijpers, T. W., & Roos, D. (2004). Apoptosis of neutrophils. Acta haematologica, 111(1-2), 56-66.
149. Male D., Brostoff J., Roth D. B., Roitt I. (2007). Immunologie. 7ème edition.
150. Malle, E., Furtmüller, G., Sattler, W., and Obinger, C. (2007) Myeloperoxidase: a target for new drug development? British Journal of Pharmacology. 152,838-854.
151. Mallem Y, Gogny M (2014). Anti-inflammatoires en médecine vétérinaire. EMC-Vétérinaire. 0(0):1-12.
152. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nature reviews immunology, 11(8), 519.
153. Markov, P. A., Popov, S. V., Nikitina, I. R., Ovodova, R. G., & Ovodov, Y. S. (2011). Anti-inflammatory activity of pectins and their galacturonan backbone. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 37(7), 817-821.
154. Mathews K, Boston S (2013). Nonsteroidal antiinflammatory analgesics. In: Chandler ML, Twedt DC, Steiner JM, Washa bau RJ, Syring RJ, Willard MD. Philadelphia: Canine and
155. Mathieu, M. J., & Fonteneau, J. M. (2008). Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie. Prophyre. 55-59.
156. Mawa, S., Jantan, I., & Husain, K. (2016). Isolation of terpenoids from the stem of Ficus aurantiaca Griff and their effects on reactive oxygen species production and chemotactic activity of neutrophils. Molecules, 21(1), 9.

157. Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 9, 181-218.
158. Meziti, A. (2018). Régulation de l'inflammation par les extraits de Rubus fruticosus et Zizyphus vulgaris (Doctoral dissertation).
159. Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C., & Ashton, B. A. (2002). Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. Blood, 100(12), 3853-3860.
160. Mishra, A., Paul, S., & Swarnakar, S. (2011). Downregulation of matrix metalloproteinase-9 by melatonin during prevention of alcohol-induced liver injury in mice. Biochimie, 93(5), 854-866.
161. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. Antioxid Redox Signal. 20(7):1126-1167.
162. Montanher, A. B., Zucolotto, S. M., Schenkel, E. P., & Fröde, T. S. (2007). Evidence of anti-inflammatory effects of Passiflora edulis in an inflammation model. Journal of Ethnopharmacology, 109(2), 281-288.
163. Mouzaoui, S., Rahim, I., & Djerdjouri, B. (2012). Aminoguanidine and curcumin attenuated tumor necrosis factor (TNF)-α-induced oxidative stress, colitis and hepatotoxicity in mice. International immunopharmacology, 12(1), 302-311.
164. Nahm M. H. et Burton R. L. (2011). Protocole pour le test multiplex d'opsonophagocytose et de destruction (UABMOPA) du Pneumocoque par les anticorps. Bacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratory: 1-47.
165. Nastasijević, B., Lazarević-Pašti, T., Dimitrijević-Branković, S., Pašti, I., Vujačić, A., Joksić, G., & Vasić, V. (2012). Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of Gentiana lutea extracts. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 66, 191-196.
166. Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nature reviews immunology, 6(3), 173.
167. Nauseef, W. M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. Immunological reviews, 219(1), 88-102.
168. Nauseef, W. M., McCormick, S., & Goedken, M. (2000). Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase. Redox Report, 5(4), 197-206.
169. Nauseef, W.M. (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. Histochem Cell Biol 122, 277-91.
170. Ndrepepa, G. (2019). Myeloperoxidase–A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. Clinica Chimica Acta.

171. Nourshargh, S., & Marelli-Berg, F. M. (2005). Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. Trends in immunology, 26(3), 157-165.
172. Orliaguet, G., Gall, O., & Benabess-Lambert, F. (2013). Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. Le Praticien en Anesthésie Réanimation, 17(5), 228-237.
173. Ovodova, R. G., Bushneva, O. A., Shashkov, A. S., Chizhov, A. O., & Ovodov, Y. S. (2005). Structural studies on pectin from marsh cinquefoil Comarum palustre L. Biochemistry (Moscow), 70(8), 867-877.
174. Ozenda, P. (1977). Flore du Sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, 15, quai Anatole-France, Paris: 360-361.
175. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., & Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(25), 13766-13771.
176. Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., & Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. Cellular & molecular immunology, 12(1), 5.
177. Pereira, L. D. P., Mota, M. R., Brizeno, L. A., Nogueira, F. C., Ferreira, E. G., Pereira, M. G., & Assreuy, A. M. (2016). Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from Caesalpinia ferrea stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF-α, IL-1β, NO, TGF-β. Journal of ethnopharmacology, 187, 213-223.
178. Pereira, L., & Mesquita, J. F. (2003). Carrageenophytes of occidental Portuguese coast: 1-spectroscopic analysis in eight carrageenophytes from Buarcos bay. Biomolecular Engineering, 20(4-6), 217-222.
179. Pollard, T. D., Blanchoin, L., & Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 29(1), 545-576.
180. Popov, S. V., Markov, P. A., Nikitina, I. R., Petrishev, S., Smirnov, V., & Ovodov, Y. S. (2006a). Preventive effect of a pectic polysaccharide of the common cranberry Vaccinium oxycoccos L. on acetic acid-induced colitis in mice. World journal of gastroenterology: WJG, 12(41), 6646.
181. Popov, S. V., Ovodova, R. G., Markov, P. A., Nikitina, I. R., & Ovodov, Y. S. (2006b). Protective effect of comaruman, a pectin of cinquefoil Comarum palustre L., on acetic acid-induced colitis in mice. Digestive diseases and sciences, 51(9), 1532.

182. Popov, S. V., Popova, G. Y., Ovodova, R. G., & Ovodov, Y. S. (2005). Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from Comarum palustre. Fitoterapia, 76(3-4), 281-287.

183. Popov, S. V., Popova, G. Y., Ovodova, R. G., Bushneva, O. A., & Ovodov, Y. S. (1999). Effects of polysaccharides from Silene vulgaris on phagocytes. International journal of immunopharmacology, 21(9), 617-624.

184. Popov, S. V., Vinter, V. G., Patova, O. A., Markov, P. A., Nikitina, I. R., Ovodova, R. G., ... & Ovodov, Y. S. (2007). Chemical characterization and anti-inflammatory effect of rauvolfian, a pectic polysaccharide of Rauvolfia callus. Biochemistry (Moscow), 72(7), 778-784.

185. Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J., Linner, J.G. (1992) Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. Blood 79,1563-73.

186. Raad H, Paclet MH, Boussetta T, Kroviarski Y, Morel F, Quinn MT, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM, El-Benna J (2009). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. FASEB J, 23(4)1011-1022.

187. Rankin, J. A. (2004). Biological mediators of acute inflammation. AACN Advanced Critical Care, 15(1), 3-17.

188. Richard D; Chevalet P; Fournel S; Giraud N; Gros F; Laurenti P; Pradére F & Soubaya T. (2012). Biologie. Tout les cours en fiches. Les défenses de l'organisme. Éd : Dunod .PP :510-542.

189. Rimbau, V., Cerdan, C., Vila, R., & Iglesias, J. (1999). Antiinflammatory activity of some extracts from plants used in the traditional medicine of North-African countries (II). Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 13(2), 128-132.

190. Rocha, A. C., Fernandes, E. S., Quintão, N. L., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2006). Relevance of tumour necrosis factor-α for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. British journal of pharmacology, 148(5), 688-695.

191. Roos, D., De Boer, M., Kuribayashi, F., Meischl, C., Weening, R. S., Segal, A. W., Ahlin, A., Nemet, K., Hossle, J.P., Bernatowska-Matuszkiewicz, E. & Middleton-Price, H. (1996). Mutations in the X-linked and autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. Blood, 87(5), 1663-1681.

192. Rosales, JL, Ernst JD (1997). Calcium-dependent neutrophil secretion:characterization and regulation by annexines. Journal of Immunology, 159, 6195-6202.
193. Rosenbauer F & Tenen DG (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. Nat Rev Immunol 7: 105–117
194. Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). Histology. Lippincott Williams & Wilkins.
195. Sabroe I., Prince L.R., Jones E.C., Horsburgh M.J., Foster S.J., Vogel S.N., Dower S.K., Whyte M.K. (2003). Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. J Immunol. 170(10): 5268-5275.
196. Samout, N., Ettayaa, A., Bouzennaa, H., Ncib, S., Elfekia, A. & Hfaiedh, N. (2016). Beneficial effects of Plantago albicans on high-fat diet-induced obesity in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy, 84, 1768-1775.
197. Samstag, Y., Eibert, S. M., Klemke, M., & Wabnitz, G. H. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. Journal of leukocyte biology, 73(1), 30-48.
198. Sarantis, H., & Grinstein, S. (2012). Subversion of phagocytosis for pathogen survival. Cell host & microbe, 12(4), 419-431.
199. Scapini, P., Carletto, A., Nardelli, B., Calzetti, F., Roschke, V., Merigo, F., Tamassia, N., Pieropan, S., Biasi, D., Sbarbati, A., Sozzani, S., Bambara, L., & Cassatella, M.A. (2005). Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. Blood, 105(2), 830-837.
200. Schepetkin, I. A., & Quinn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. International immunopharmacology, 6(3), 317-333.
201. Scher, J. U., Abramson, S. B., & Pillinger, M. H. (2010). Neutrophils I. In Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press, Cambridge.
202. Schoroderet M. (1992). Phrmacologie., des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Volume 2. Eds., Office des publications universitaires (Alger)., Pp : 523-530.
203. Seely JEA, Pascual JL, Christou NV (2003). Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. Critical Care, 7, 291-307.
204. Segal A.W. (2005). HowNeutrophils kill microbs. Annu Rev Immunol. 23: 197-223.

205. Selemidis, S., Sobey, C.G., Wingler, K., Schmidt, H.H.H.W., and Drummond, G.R. (2008) NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. Pharmacology & Therapeutics. 120(3),254-291.
206. Sengeløv, H., Kjeldsen, L., & Borregaard, N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. The Journal of Immunology, 150(4), 1535-1543.
207. Serhan, C. N. (2010). Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?. The American journal of pathology, 177(4), 1576-1591.
208. Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nature Reviews Immunology, 8(5), 349.
209. Serhan, C. N., Ward, P. A., & Gilroy, D. W. (Eds.). (2010). Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press.
210. Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., & Deby-Dupont, G. (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. Ann. Méd. Vét, 147, 79-93.
211. Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J., Banerjee A., Silliman C.C. (2005). Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. Journal of leukocyte biology. 78(5): 1025-1042.
212. Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. The Journal of clinical investigation, 122(3), 787-795.
213. Silva, R. O., Damasceno, S. R., Brito, T. V., Dias, J. M., Fontenele, A. M., Braúna, I. S., ... & Souza, M. H. (2015). Polysaccharide fraction isolated from Passiflora edulis inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 67(7), 1017-1027.
214. Silva, V. G., Silva, R. O., Damasceno, S. R., Carvalho, N. S., Prudêncio, R. S., Aragão, K. S., ... & Leite, J. R. S. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from Pilocarpus microphyllus. Journal of natural products, 76(6), 1071-1077.
215. Slotwinska, S. M. (2013). The interleukin-1 receptor antagonist (IL-1-Ra) and soluble tumor necrosis factor receptor I (sTNF RI) in periodontal disease. Open Journal of Immunology, 3(01), 10.
216. Smith, J.A. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. Journal of Leukocyte Biology. 56(6),672-686.

217. Song, X., Shen, Q., Liu, M., Zhang, C., Zhang, L., Ren, Z., ... & Jia, L. (2018). Antioxidant and hepatoprotective effects of intracellular mycelium polysaccharides from Pleurotus geesteranus against alcoholic liver diseases. International journal of biological macromolecules, 114, 979-988.
218. Stasia, M. J. (2007). The X+ chronic granulomatous disease as a fabulous model to study the NADPH oxidase complex activation. Medecine sciences: M/S, 23(5), 526-532.
219. Stipp, M. C., de Lacerda Bezerra, I., Corso, C. R., dos Reis Livero, F. A., Lomba, L. A., Caillot, A. R. C., ... & Sassaki, G. L. (2017). Necroptosis mediates the antineoplastic effects of the soluble fraction of polysaccharide from red wine in Walker-256 tumor-bearing rats. Carbohydrate polymers, 160, 123-133.
220. Strehl C, Spies CM, Buttgereit F (2011). Pharmacody-namics of glucocorticoids. Clin Exp Rheumatol. 29 (68):13Ŕ18.
221. Suk, K. T., Kim, M. Y., & Baik, S. K. (2014). Alcoholic liver disease: Treatment. World Journal of Gastroenterology: WJG, 20(36), 12934.
222. Tauber, A.I. (1987). Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. Blood. 69(3),711-720.
223. Taurog, A., & Dorris, M. L. (1992). Myeloperoxidase-catalyzed iodination and coupling. Archives of biochemistry and biophysics, 296(1), 239-246.
224. Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. Frontiers in immunology, 5, 508.
225. Thomson, D., Panagos, C. G., Venkatasamy, R., Moss, C., Robinson, J., Bavington, C. D., ... & Page, C. P. (2016). Structural characterization and anti-inflammatory activity of two novel polysaccharides from the sea squirt, Ascidiella aspersa. Pulmonary pharmacology & therapeutics, 40, 69-79.
226. Tian, M., & Wang, M. (2006). Studies on extraction, isolation and composition of Lycium barbarum polysaccharides. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica, 31(19), 1603-1607.
227. Tong, H., Tian, D., He, Z., Liu, Y., Chu, X., & Sun, X. (2013). Polysaccharides from Bupleurum chinense impact the recruitment and migration of neutrophils by blocking fMLP chemoattractant receptor-mediated functions. Carbohydrate polymers, 92(2), 1071-1077.
228. Underhill, D. M., & Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Current opinion in immunology, 14(1), 103-110. University Press.p:1-4.
229. Usov, Anatolii I. (2011). Polysaccharides of the red algae. In Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry (Vol. 65, pp. 115-217). Academic Press.

230. Van Goethem, E. (2010). Caractérisation de la migration trans-matricielle des phagocytes humains (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
231. Viana, C. T. R., Castro, P. R., Marques, S. M., Lopes, M. T. P., Gonçalves, R., Campos, P. P., & Andrade, S. P. (2015). Differential contribution of acute and chronic inflammation to the development of murine mammary 4T1 tumors. PloS one, 10(7), e0130809.
232. Voisin A. (1987). Utilisation des plantes médicinales dans le souf au 19 ème siècle. Le Sahara, 1er trimestre, 100, 25-28.
233. Vonkeman HE, Laar MAV (2008). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Adverse Effects and their Prevention. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 10, 10-16.
234. Wagner, J. G., & Roth, R. A. (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. Pharmacological reviews, 52(3), 349-374.
235. Wanikiat, P., Panthong, A., Sujayanon, P., Yoosook, C., Rossi, A. G., & Reutrakul, V. (2008). The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by Barleria lupulina and Clinacanthus nutans extracts. Journal of ethnopharmacology, 116(2), 234-244.
236. Weill B., Batteux F., Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et reactions inflammatoires. Eds., De Boeck Universite (Paris)., Pp: 12-23.
237. Weiner O.D. (2002). Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. Current Opinion in Cell Biology 14: 196-202.
238. Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydrate polymers, 84(1), 14-21.
239. Winyard PG, Blake DR, Evans CH (2013).Free Radicals and Inflammation.Berlin: Springer Basel. p:3-15.
240. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., & Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Laboratory investigation, 80(5), 617.
241. Wolf, K., & Friedl, P. (2011). Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. Trends in cell biology, 21(12), 736-744.
242. Wright, C. D., & Nelson, R. D. (1988). Candidacidal activity of myeloperoxidase: characterization of myeloperoxidase-yeast complex formation. Biochemical and biophysical research communications, 154(2), 809-817.

243. Xia, Y., & Zweier, J. L. (1997). Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. Analytical biochemistry, 245(1), 93-96.

244. Xu, Y., Loison, F., & Luo, H. R. (2010). Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3Kγ, ROS, and actin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(7), 2950-2955.

245. Yang, C., He, N., Ling, X., Ye, M., Zhang, C., Shao, W., & Li, Q. (2008). The isolation and characterization of polysaccharides from longan pulp. Separation and Purification Technology, 63(1), 226-230.

246. Yin, H. M., Wang, S. N., Nie, S. P., & Xie, M. Y. (2018). Coix polysaccharides: gut microbiota regulation and immunomodulatory. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.

247. Yonekawa, K., & Harlan, J. M. (2005). Targeting leukocyte integrins in human diseases. Journal of leukocyte biology, 77(2), 129-140.

248. Young M., Alders R., Grimes S., Spradbrow P., Dias P., Da Silva A. et Lobo Q., 2012- Le Contrôle de la Maladie de Newcastle chez les poulets de village : un manuel de laboratoire. 2e édition. Monographie ACIAR N°. 87a. Centre Australien international pour la recherche agricole, Canberra, 153 p.

249. Yue, L., Wang, W., Wang, Y., Du, T., Shen, W., Tang, H., ... & Yin, H. (2016). Bletilla striata polysaccharide inhibits angiotensin II-induced ROS and inflammation via NOX4 and TLR2 pathways. International journal of biological macromolecules, 89, 376-388.

250. Zarbock A, Ley K (2008). Biological perspectives: mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. The American Journal of Pathology, 172, 1-7.

251. Zhang, A. Q., Xu, M., Fu, L., & Sun, P. L. (2013). Structural elucidation of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies of Pleurotus geesteranus. Carbohydrate polymers, 92(1), 236-240.

252. Zhang, R., Brennan, M. L., Fu, X., Aviles, R. J., Pearce, G. L., Penn, M. S., TOPOL E.J., SPRECHER D.L., HAZEN S.L. (2001). Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. Jama, 286(17), 2136-2142.

253. Zhao, H., Wang, Q., Sun, Y., Yang, B., Wang, Z., Chai, G., Guan, Y., Zhu, W., Shu, Z., Lei, X., & Kuang, H. (2014). Purification, characterization and immunomodulatory effects of Plantago depressa polysaccharides. Carbohydrate Polymers, 112, 63-72.

254. Zhou, G., Sun, Y., Xin, H., Zhang, Y., Li, Z., & Xu, Z. (2004). In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from Chondrus ocellatus. Pharmacological research, 50(1), 47-53.

255. Zhuan-Yun, L., Xue-Ping, Y., Bin, L., Reheman, H. N., Yang, G., Zhan, S., & Qi, M. A. (2015). Auricularia auricular judae polysaccharide attenuates lipopolysaccharide induced acute lung injury by inhibiting oxidative stress and inflammation. Biomedical reports, 3(4),478-482.

# *Résumés*

**Activité anti-inflammatoire des polysaccharides hydrosolubles issus de quelques plantes spontanées à caractère médicinal sur les neutrophiles humains activés**

***Résumé***

L'activité anti-inflammatoire des extraits polysaccharidiques issus de graines de *Plantago notata* (PSPn) et de *Plantago albicans* (PSPc) a été étudiée. Le potentiel anti-inflammatoire des extraits est évalué par l'investigation de leurs effets sur l'activité de la NADPH oxydase et de la myéloperoxydase (MPO) des neutrophiles humains stimulés par le phorbol 12-myristate 13-acétate. La NADPH oxydase et la MPO sont deux enzymes clés dans la réponse inflammatoire, leurs activités génèrent des espèces réactives de l'oxygène. Ces espèces produites sont nécessaires pour la dégradation des agents pathogènes. L'activité de la NADPH oxydase est mesurée par réduction de ferricytochrome C en ferrocytochrome C, alors que l'activité de la MPO est évaluée par la peroxydation de 4-aminoantipyrine, un chromophore, en Quinone imine. Les résultats obtenus montrent que l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles est significativement inhibée d'une manière concentration-dépendante par le PSPc et le PSPn. Cette inhibition est de 49.39% et 63.08% à 100µg/ml pour le PSPc et le PSPn, respectivement. De même, ces deux extraits ont exercés un effet inhibiteur important sur l'activité de la MPO des neutrophiles, avec une moyenne de 41.16% à 100µg/ml pour les deux extraits PSPc et PSPn. En conclusion, le PSPn et le PSPc, prouvent leur potentiel anti-inflammatoire, via leurs capacités inhibitrices sur le fonctionnement de la NADPH oxydase et de la MPO. En effet, ces deux plantes à usage phytomédicinal peuvent être considérées comme une source naturelle de polysaccharides bioactives.

**Mots clés** : Polysaccharides, *Plantago notata*, *Plantago albicans*, Neutrophile, NADPH oxydase, Myéloperoxydase, Anti-inflammatoire.

**Anti-inflammatory activity of water-soluble polysaccharides derived from some spontaneous medicinal plants on activated human neutrophils**

***Abstract***

The anti-inflammatory activity of polysaccharides extracts derived from the seeds of *Plantago notata* (PSPn) and *Plantago albicans* (PSPc) has been studied. The anti-inflammatory potential of the extracts is evaluated by the investigation of their effects on the activity of NADPH oxidase and myeloperoxidase (MPO) of human neutrophils stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. NADPH oxidase and MPO are two key enzymes in the inflammatory response, their activities generate reactive oxygen species. These produced species are necessary for the degradation of pathogens. The activity of NADPH oxidase is measured by the reduction of ferricytochrome C to ferrocytochrome C. while the activity of MPO is evaluated by peroxidation of 4-aminoantipyrine, a chromophore, to Quinone imine. The results obtained show that the activity of neutrophils NADPH oxidase is significantly inhibited in a concentration-dependent manner by PSPc and PSPn. This inhibition is 49.39% and 63.08% at 100µg/ml for PSPc and PSPn, respectively. Similarly, these two extracts exerted an important inhibitory effect on the activity of neutrophils MPO, with an average of 41.16% at 100µg/ml for the two extracts PSPc and PSPn. In conclusion, the PSPn and the PSPc, prove their anti-inflammatory potential, via their inhibitory capacities on the functioning of NADPH oxidase and the MPO. Indeed, these two plants for phytomedicinal use can be considered as a natural source of bioactive polysaccharides.

**Key words** : Polysaccharides, *Plantago notata*, *Plantago albicans*, Neutrophil, NADPH oxidase, Myeloperoxydase, Anti-inflammatory.

**النشاط المضاد للإلتهابات لمتعدد السكريات القابلة للذوبان في الماء المستخلصة من بعض النباتات التلقائية ذات الميزة الطبية على العدلات البشرية المنشطة**

***الملخص***

نشاط السكريات المتعددة المستلخصة من بذور نبتة أدان (PSPn) *Plantago notata* ونبتة لقمة الناجي (PSPc) *Plantago albicans* المضاد للإتهابات تم دراسته. قدرة مستخلصات السكريات المتعددة المضادة للإلتهابات تم تقييمها بعد دراسة تأثيراتها على نشاط كل من أنزيمي العدلات البشرية NADPH oxydase و myéloperoxydase (MPO) , المحفزة ب phorbol 12-myristate 13-acétate. NADPH oxydase و MPO هما أنزيمين رئيسيين في الإستجابة الإلتهابية, نشاطهما يولد أنواع الأكسجين التفاعلية. هذه الأنواع المنتجة ضرورية للقضاء على مسببات الأمراض. نشاط NADPH oxydase تم قياسه بتفاعل إرجاع ferricytochrome C إلى ferrocytochrome C , بينما نشاط MPO تم تقييمه عن طريق تفاعل بيروكسيد 4-aminoantipyrine –حامل اللون- إلى Quinone imine. النتائج التي تم الحصول عليها تبين أن نشاط أنزيم العدلات NADPH oxydase تم تثبيطه بشكل كبير بطريقة طردية مع تركيز المستخلص PSPc و PSPn. هذا التثبيط قدره 49.39% و 63.08% في تركيز 100ميكروغرام/مل من PSPc و PSPn على الترتيب. وبالمثل، فإن هذين المستخلصين كان لهما تأثير مثبط هام على نشاط MPO بمتوسط 41.16% في تركيز 100 ميكروغرام/مل لكل من المستخلصين PSPn وPSPc. في الختام المستخلصين PSPn و PSPc أثبتا قدرتهما المضادة للإلتهابات, من خلال إمكنياتهما المثبطة لعمل الأنزيمين NADPH oxydase و MPO. لذلك ، يمكن اعتبار هذين النبتتين المستعملتين في الطب النباتي مصدرًا طبيعيًا للسكريات المتعددة النشطة بيولوجيًا

**الكلمات المفتاحية :** السكريات المتعددة، *Plantago notata*، *Plantago albicans*، العدلات، NADPH oxydase، Myéloperoxydase، مضاد للإلتهابات.

## *Résumé*

L'activité anti-inflammatoire des extraits polysaccharidiques issus de graines de *Plantago notata* (PSPn) et de *Plantago albicans* (PSPc) a été étudiée. Le potentiel anti-inflammatoire des extraits est évalué par l'investigation de leurs effets sur l'activité de la NADPH oxydase et de la myéloperoxydase (MPO) des neutrophiles humains stimulés par le phorbol 12-myristate 13-acétate. La NADPH oxydase et la MPO sont deux enzymes clés dans la réponse inflammatoire, leurs activités génèrent des espèces réactives de l'oxygène. Ces espèces produites sont nécessaires pour la dégradation des agents pathogènes. L'activité de la NADPH oxydase est mesurée par réduction de ferricytochrome C en ferrocytochrome C, alors que l'activité de la MPO est évaluée par la peroxydation de 4-aminoantipyrine, un chromophore, en Quinone imine. Les résultats obtenus montrent que l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles est significativement inhibée d'une manière concentration-dépendante par le PSPc et le PSPn. Cette inhibition est de 49.39% et 63.08% à 100µg/ml pour le PSPc et le PSPn, respectivement. De même, ces deux extraits ont exercés un effet inhibiteur important sur l'activité de la MPO des neutrophiles, avec une moyenne de 41.16% à 100µg/ml pour les deux extraits PSPc et PSPn. En conclusion, le PSPn et le PSPc, prouvent leur potentiel anti-inflammatoire, via leurs capacités inhibitrices sur le fonctionnement de la NADPH oxydase et de la MPO. En effet, ces deux plantes à usage phytomédicinal peuvent être considérées comme une source naturelle de polysaccharides bioactives.



**Mots clés** : Polysaccharides, *Plantago notata*, *Plantago albicans*, Neutrophile, NADPH oxydase, Myéloperoxydase, Anti-inflammatoire.



## *Abstract*

The anti-inflammatory activity of polysaccharides extracts derived from the seeds of *Plantago notata* (PSPn) and *Plantago albicans* (PSPc) has been studied. The anti-inflammatory potential of the extracts is evaluated by the investigation of their effects on the activity of NADPH oxidase and myeloperoxidase (MPO) of human neutrophils stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate. NADPH oxidase and MPO are two key enzymes in the inflammatory response, their activities generate reactive oxygen species. These produced species are necessary for the degradation of pathogens. The activity of NADPH oxidase is measured by the reduction of ferricytochrome C to ferrocytochrome C. while the activity of MPO is evaluated by peroxidation of 4-aminoantipyrine, a chromophore, to Quinone imine. The results obtained show that the activity of neutrophils NADPH oxidase is significantly inhibited in a concentration-dependent manner by PSPc and PSPn. This inhibition is 49.39% and 63.08% at 100µg/ml for PSPc and PSPn, respectively. Similarly, these two extracts exerted an important inhibitory effect on the activity of neutrophils MPO, with an average of 41.16% at 100µg/ml for the two extracts PSPc and PSPn. In conclusion, the PSPn and the PSPc, prove their anti-inflammatory potential, via their inhibitory capacities on the functioning of NADPH oxidase and the MPO. Indeed, these two plants for phytomedicinal use can be considered as a natural source of bioactive polysaccharides.



**Key words** : Polysaccharides, *Plantago notata*, *Plantago albicans*, Neutrophil, NADPH oxidase, Myeloperoxydase, Anti-inflammatory.



## *الملخص*

نشاط السكريات المتعددة المستلخصة من بذور نبتة أدان *Plantago notata* (PSPn) ونبتة لقمة الناجي *Plantago albicans* (PSPc) المضاد للإلتهابات تم دراسته. قدرة مستخلصات السكريات المتعددة المضادة للإلتهابات تم تقييمها بعد دراسة تأثيراتها على نشاط كل من أنزيمي العدلات البشرية NADPH oxydase و myéloperoxydase (MPO) ، المحفزة ب phorbol 12-myristate 13-acétate. NADPH oxydase و MPO هما أنزيمين رئيسيين في الإستجابة الإلتهابية, نشاطهما يولد أنواع الأكسجين التفاعلية. هذه الأنواع المنتجة ضرورية للقضاء على مسببات الأمراض. نشاط NADPH oxydase تم قياسه بتفاعل إرجاع ferricytochrome C إلى ferrocytochrome C ، بينما نشاط MPO تم تقييمه عن طريق تفاعل بيروكسيد 4-aminoantipyrine –حامل اللون- إلى Quinone imine. النتائج التي تم الحصول عليها تبين أن نشاط أنزيم العدلات NADPH oxydase تم تثبيطه بشكل كبير بطريقة طردية مع تركيز المستخلص PSPc و PSPn. هذا التثبيط قدره 49.39% و 63.08% في تركيز 100ميكروغرام/مل من PSPc و PSPn على الترتيب. وبالمثل، فإن هذين المستخلصين كان لهما تأثير مثبط هام على نشاط MPO بمتوسط 41.16% في تركيز 100 ميكروغرام/مل لكل من المستخلصين PSPn وPSPc. في الختام المستخلصين PSPn و PSPc أثبتا قدرتهما المضادة للإلتهابات, من خلال إمكنياتهما المثبطة لعمل الأنزيمين NADPH oxydase و MPO. لذلك ، يمكن اعتبار هذين النبتتين المستعملتين في الطب النباتي مصدرًا طبيعيًا للسكريات المتعددة النشطة بيولوجيًا



**الكلمات المفتاحية :** السكريات المتعددة، *Plantago notata*، *Plantago albicans*، العدلات، NADPH oxydase، Myéloperoxydase ، مضاد للإلتهابات.