

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE 8 MAI 1945 - GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



THÈSE

EN VUE DE L' OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES BIOLOGIQUES

THÈME

Effet de deux plantes médicinales *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum* sur le système immunitaire

Présentée par :

BOUKEMARA Hanane

Devant le jury :

Président:	BENOUARETH D.E.	Prof	Université de Guelma
Rapporteur:	BENDJEDDOU D.	Prof	Université de Guelma
Co-Rapporteur:	Marie J-C.	PhD	CNRS, Paris
Examineur:	NECIB Y.	Prof	Université de Constantine
Examineur:	SAKA S.	Prof	Université d'Annaba

Année Universitaire : 2016/2017

Remerciements

Je tiens à remercier et à exprimer ma profonde gratitude au **Pr BENDJEDDOU Dalila** qui m'a encadré pendant toutes ces années de thèse, pour ses caractères personnels et scientifiques exceptionnels, sa patience que j'estime beaucoup, son soutien, sa disponibilité et surtout pour les conseils et l'encadrement de ce travail. Votre grande expérience et votre encouragement ont permis la réalisation de la thèse.

Je remercie également le **Dr MARIE Jean-Claude**, Co-directeur de cette thèse, j'ai été très sensible à votre grande disponibilité, à vos encouragements, à la confiance que vous avez bien voulu placer en moi et à toutes vos initiatives à trouver les accompagnements nécessaires à la réalisation de cette thèse. Merci pour votre soutien inconditionné. Je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon profond respect.

Je remercie le **Pr BENOUARETH D.E.** en acceptant de lire, instruire et de juger cette Thèse. Merci pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Trouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

J'adresse tous mes remerciements au **Pr NECIB Y** et au **Pr SAKA S** pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Un grand merci à **Dr EL BENNA Jamel** pour m'avoir accueillie au sein de l'unité INSERM 1149 (Centre de Recherche sur l'inflammation (CRI) de la Faculté de Médecine Xavier Bichat) dans laquelle j'ai réalisé une grande partie de ma thèse. Encore merci Jamel pour vos précieux conseils, pour votre encouragement et votre grande disponibilité. Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance et mon profond respect.

Je remercie également tous les autres chercheurs de l'équipe auprès de qui je me suis sentie en famille, **Dr DANG My-Chan**, **Dr PERIANIN Axel**, **Dr HURTADO-NEDELEC Margarita**, **Dr KOTELEVETS Larissa** et **Dr CHASTRE Eric** pour leurs gentilles, leurs conseils précieux et leurs discussions fructueuses au cours des réunions de l'équipe.

Mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Je ne saurais remercier ici mes amis **ROLAS Loïc**, **BOUSSIF Abdelali**, **BELAMBRI Sahra Amel**, **BOUDIAF Kaouthar** et **MARZAIOLI Viviana** qui n'ont laissé aucun effort pour venir à mon aide, merci aussi pour tous les bons moments passés.

Finalement, Je souhaite remercier mes parents qui m'ont toujours permis de choisir mon chemin et qui m'ont encouragé à continuer dans la voie de la science et qui ont tant sacrifié pour moi. Merci à mes sœurs et mes frères pour leurs encouragements et leurs soutiens

REMERCIEMENTS

pendant toutes ces années d'études. Sincères et grands remerciements à mon mari **Hichem** qui m'a aidé à tous les niveaux moral et affectif afin de me permettre de travailler dans d'excellentes conditions.

Résumé

Les neutrophiles sont les cellules effectrices clés du système immunitaire inné et leur NADPH-oxidase (NOX2) induit une forte activité antimicrobienne en générant les FRO. Cependant, une production excessive des FRO ainsi qu'une exocytose des granules contenant la myéloperoxydase (MPO) peut exacerber plutôt que réduire l'inflammation conduisant à des maladies inflammatoires chroniques et aiguës sévères. Ainsi, la régulation de la production de FRO représente une cible thérapeutique importante. Dans ce contexte, de nombreuses études ont été menées pour identifier des molécules capables d'inhiber les fonctions des phagocytes, en particulier la production des FRO, à des fins thérapeutiques. Dans le présent travail, nous avons noté avec intérêt que les extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum*, inhibent de manière dose dépendante l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Le taux d'inhibition induit par les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* à 300 mg/kg, est respectivement de $61,21 \pm 7,347 \%$ et $45 \pm 8,461 \%$ par rapport au témoin. Ces effets pourraient être attribués à leur inhibition efficace de la production de FRO *in vitro* observée avec le sang humain total et les phagocytes fraîchement isolés en réponse au N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF). Les extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* inhibent la production de FRO de neutrophiles induite par le fMLF ou le phorbol myristate acetate (PMA). Les effets inhibiteurs de ces extraits sont en partie dus à une activité 'scavenger' d' H_2O_2 et *Anvillea garcinii* est la plus efficace. Cependant, les deux extraits n'ont pas une activité 'scavenger' d' O_2^- selon notre étude *in vitro* utilisant le cytochrome C. De plus, nos résultats ont montré que les deux extraits n'ont pas d'effet cytotoxique sur les neutrophiles. En outre, les résultats ont indiqué que les extraits d'*Anvillea garcinii* inhibent fortement la production d' O_2^- par la NOX2 des neutrophiles induite par le PMA et cela de manière dose dépendante par un mécanisme impliquant l'inhibition de la translocation de la $p47^{phox}$ et la PKC β vers la membrane plasmique de neutrophile. *Anvillea garcinii* inhibe la phosphorylation de la Ser328 de la $p47^{phox}$. *Anvillea garcinii* inhibe aussi la phosphorylation de ERK1/2 et de p38MAPK induite par le PMA. Les extraits de *Zygophyllum gaetulum* et d'*Anvillea garcinii* ont inhibé la libération de la MPO dans le milieu extracellulaire et l'augmentation de l'expression membranaire de CD11b. A cet égard, les polysaccharides d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* détiennent un potentiel thérapeutique prometteur.

Mots clés: polysaccharides; *Anvillea garcinii*; *Zygophyllum gaetulum*; neutrophiles; inflammation; NADPH Oxydase; FRO ; $p47^{PHOX}$; phosphorylation; dégranulation.

Abstract

Neutrophils are key effector cells of the innate immune system and their NADPH-oxidase (NOX2) induces a strong anti-microbial activity by generating ROS. However, excessive ROS production as well as exocytosis of granules containing myeloperoxidase (MPO) can exacerbate rather than curtail inflammation leading to several chronic and acute inflammatory diseases. Thus, regulation of ROS production represents an important therapeutic target. In this setting, many studies have been carried out to identify molecules capable of inhibiting phagocytes functions, in particular ROS production, for therapeutic purposes. In the present study, interestingly, *Anv* and *Zyg* extracts dose-dependently inhibited the xylene-induced ear edema in mice and at the dose of 300mg/kg, the inhibition was 61.21 ± 7.347 % and 45 ± 8.461 % versus control, respectively. These effects could be attributed to their effective *in vitro* inhibition on ROS production observed in whole human blood and freshly isolated phagocytes in response to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF). When neutrophils were challenged with fMLF and or phorbol myristate acetate (PMA), *Anv* and *Zyg* extracts dose-dependently inhibited the induced ROS generation. Such effects can be in part due to H₂O₂ scavenging activity by *Zyg* and *Anv* extracts and the most effective being the latter. However, the two extracts did not scavenge *in vitro* O₂⁻ generation by xanthine oxidase as measured with cytochrome c. Both extracts did not have a cytotoxic effect on neutrophils. Thus the effect of the extracts on neutrophil NOX2 production of O₂⁻ warranted investigation and they dose-dependently inhibited the responses induced by either fMLF or PMA. Moreover, *Anv* extract strongly inhibited PMA response and the mechanism involved an inhibition of p47^{phox} and PKC β translocation to the neutrophil plasma membrane. *Anv* inhibited Ser328 phosphorylation of p47^{phox}. Also, *Anv* inhibited the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK induced by PMA. Further, independently of ROS production, both *Anv* and *Zyg* extract inhibited by the PMA- or fMLF-stimulation of neutrophil degranulation as measured by MPO release in the surrounds and increased CD11b membrane expression. In this regard the polysaccharide extracts of *Anvillea garcinii* and *Zygophyllum gaetulum* holds promising therapeutic potential.

Key Words: polysaccharides; *Anvillea garcinii*; *Zygophyllum gaetulum*; neutrophils; inflammation; NADPH Oxidase; ROS; p47^{PHOX}; phosphorylation; degranulation.

ملخص

تلعب الخلايا المتعادلة دورا رئيسيا في المناعة الطبيعية، وذلك عن طريق تنشيط إنزيم (NOX2) NADPH oxidase لإنتاج كمية ضخمة من الأنواع الاكسيجينية النشطة (ROS). لكن الإنتاج المفرط لـ ROS وكذا إفراز الحبيبات التي تحتوي على الميلوبيروكسيديز (Myeloperoxidase, MPO) يمكن أن يزيد من تفاقم الالتهاب بدلا من تقليصه مما يؤدي إلى العديد من الأمراض الالتهابية المزمنة والحادة. لذا يمثل تنظيم إنتاج ROS هدفا علاجيا هاما، وقد أجريت في هذا الإطار العديد من الدراسات للبحث عن جزيئات قادرة على تثبيط وظائف الخلايا المتعادلة ولا سيما إنتاج ROS وذلك لأغراض علاجية. بينت النتائج ان قدرة Zyg و Anv تثبطان ؛ بطريقة مرتبطة بالتركيز؛ وذمة (تورم) الأذن المحدثة بـ Xylene عند الفئران وذلك بنسبة $7.347 \pm 61.21\%$ و $8.461 \pm 45\%$ على التوالي . يمكن أن يعزى هذا التأثير الفعال إلى تثبيط إنتاج ROS الذي لوحظ *in vitro* على الدم الكلي و الخلايا المتعادلة المعزولة حديثا، استجابة للتحفيز بـ N-فورميل-ميثيونيل-لوسيل-ألانين (fMLF). عند تحفيز الخلايا المتعادلة بـ fMLF أو PMA ، تثبط مستخلصات Anv و Zyg بطريقة مرتبطة بالتركيز، إنتاج ROS. يمكن أن تعزى هذه التأثيرات جزئيا إلى النشاط الأسر (scavenger) لمستخلصي Anv و Zyg على H_2O_2 . وقد كان أظهر مستخلص Anv. فعالية أكبر في حين، لم يأسر كلا المستخلصين O_2° المنتج من طرف *in vitro* Xanthine Oxidase. كما لم يظهر كلا المستخلصين أي نشاط سمية ضد الخلايا المتعادلة. وعليه فان تأثير المستخلصات على إنتاج O_2° من طرف NOX2 للخلايا المتعادلة يبين أن مستخلصي Anv و Zyg يثبطان بطريقة متناسبة مع التركيز، الاستجابة للتحفيز بكل من fMLF و PMA. علاوة على ذلك، ثبت مستخلص Anv بقوة الاستجابة للـ PMA وترتكز الآلية على تثبيط تحوّل $p47^{phox}$ و $PKC\beta$ إلى الغشاء البلازمي. كما يثبط مستخلص Anv فسفرة $p47^{phox}$ على Ser328 وكذا فسفرة كل من ERK1/2 و p38MAPK. وبغض النظر عن ROS، يثبط مستخلصي Anv و Zyg إفراز الحبيبات من طرف الخلايا المتعادلة المحفزة والمقاس بنشاط Myeloperoxiase وكذا زيادة التعبير الغشائي لـ CD11b. و في هذا الصدد، تتمتع مستخلصات عديد السكاكر من كل من Anv و Zyg بإمكانيات علاجية واعدة.

الكلمات المفتاحية: السكريات ، *Anvillea garcinii* ، *Zygodium gaetulum* ، الخلايا المتعادلة ،

التهاب ، NADPH oxidase ، ROS ، $p47^{phox}$ ، الفسفرة ، إفراز الحبيبات.

LISTE DES ABREVIATIONS

Anv	<i>Anvillea garcinii</i>
BPI	Bacterial Permeability-Increasing protein
CD	Cluster of differentiation
CGD	Chronic granulomatous disease
CKII	Caséine kinase 2
CR	Récepteur du complément
DAG	Diacylglycerol
DC	Cellule dendritique
DFP	Diisopropyl fluorophosphates
DUOX	Dual oxidase
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid.
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid.
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAD	Flavin adenine dinucleotide
fMLF	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FRO	Formes réactives de l'oxygène
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HBSS	Hanks balanced salt solution
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukine
IP3	Inositol 1,4,5 triphosphate
kDa	Kilo dalton

LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotriène B4
LXA4	Lipoxine A4
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen extracellular kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MPO	Myéloperoxydase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT	Nitroblue tetrazolium
NETs	Neutrophil extracellular traps
NK	Natural killer
NOX	Neutrophil oxidase
PAAK	Phosphatidic acid activated kinase
PAK	p21- activated kinase
PAF	Platelet Activating Factor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PB1	Phox and Bem1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol myristate acetate
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile

PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PP1	Protein phosphatase 1
PRR	Pattern Recognition Receptors
PRR	Prolin rich region
PX	Phox homology
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser	Sérine
SH3	Src homology 3
SOD	Superoxyde dismutase
T	témoin
TBS	Tris Buffered Saline
TGF-β	Transforming growth factor beta
TLR	Toll like receptor
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
Zyg	<i>Zygothylum gaetulum</i>

LISTE DES FIURES ET DES TABLEAUX

FIGURES

- Figure 1. Neutrophile au repos sous microscope électronique à transmission.
- Figure 2. La cascade d'adhésion et de recrutement des neutrophiles.
- Figure 3. Phagocytose et activation des mécanismes de bactéricidie du neutrophile.
- Figure 4. Génération des FRO dans les neutrophils stimulés.
- Figure 5. Activation de la NADPH oxydase dans les neutrophiles.
- Figure 6. Aperçu schématique des étapes d'activation du neutrophile.
- Figure 7. la NADPH Oxydase dans le neutrophile au repos (A) et activé (B).
- Figure 8. Evènements majeurs de signalisation induits par le fMLF conduisant à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire.
- Figure 9. Aspects morphologiques de l'espèce *Zygothymus gaetulum*.
- Figure 10. Aspects morphologiques de l'espèce *Anvillea garcinii*.
- Figure 11. Les étapes de l'extraction des polysaccharides totaux.
- Figure 12. Effet anti-inflammatoire des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymus gaetulum*.
- Figure.13. Inhibition de la production des ROS par le sang humain total activé sous l'effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymus gaetulum*.
- Figure 14. Inhibition de la production des ROS par les neutrophiles et les monocytes activés sous l'effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymus gaetulum*.
- Figure 15. Effet des extraits polysaccharidiques sur la production des ROS par les neutrophiles humains.
- Figure 16. Effet des extraits polysaccharidiques d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymus gaetulum* sur la viabilité des neutrophiles humains.
- Figure 17. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymus gaetulum* sur la production d'anions superoxydes par le neutrophile humain.
- Figure 18. Effet scavenger de H₂O₂ sous l'effet des extraits polysaccharidiques.
- Figure 19. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymus gaetulum* sur la translocation de la p47^{PHOX} et de la PKC β.
- Figure 20. Effet de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymus*

gaetulum sur la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur la sérine 328.

- Figure 21. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la phosphorylation de ERK (1/2) et p38 MAPKinase.
- Figure 22. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la dégranulation des granules azurophiles des neutrophiles.
- Figure 23. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la dégranulation granules spécifiques des neutrophiles.
- Figure 24. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la mobilisation du calcium cytosolique

TABLEAUX

- Tableau 1. Contenu des granulations du PN.

Sommaire

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'inflammation.....	3
2. Le polynucléaire neutrophile.....	3
2.1. Description.....	3
2.2. Production des polynucléaires neutrophiles	4
2.3. Granulations cytoplasmiques du neutrophile.....	5
2.3.1. Granules primaires ou azurophiles	6
2.3.2. Granules spécifiques ou secondaires	6
2.3.3. Granules à gélatinase ou tertiaires	8
2.3.4. Vésicules sécrétoires.....	8
2.4. Fonctions des polynucléaires neutrophiles	9
2.4.1. Recrutement et migration vers le foyer inflammatoire.....	9
2.4.2. La dégranulation	11
2.4.3. Phagocytose et mécanismes de bactéricidie	12
2.4.4. Régulation des réponses immunitaires et production de cytokines.....	14
2.4.5. Rôle du neutrophile dans la résolution de l'inflammation	15

2.5.	Production des FRO par le neutrophile.....	16
3.	Le complexe NADPH oxydase phagocytaire nox2.....	16
3.1.	Structure et composants de NOX2.....	17
3.2.	Activation du complexe NADPH oxydase NOX2	18
3.2.1.	La NADPH oxydase au sein du neutrophile au repos	19
3.2.2.	Activation de la NADPH oxydase du neutrophile stimulé.....	20
4.	Activité anti-inflammatoire des plantes médicinales	21
5.	Les polysaccharides d'origine végétale.....	24
5.1.	Définition	24
5.2.	Propriétés thérapeutiques des polysaccharides	25
5.3.	Activités antioxydante et antiinflammatoire des polysaccharides d'origine végétale	26

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

1.	MATERIELS ET METHODES.....	29
1.1.	MATERIEL	29
1.1.1.	Milieux et réactifs.....	29
1.1.2.	Animaux	30
1.1.3.	Matériel végétal	30
1.2.	METHODES.....	30
1.2.1.	Extraction des polysaccharides solubles à l'eau chaude	30
1.2.2.	Effet des extraits de <i>Zygophyllum gaetulum</i> et <i>Anvillea garcinii</i> sur l'œdème de l'oreille de souris induit par l'xylène.	31
1.2.3.	Isolement des neutrophiles et des monocytes humains	31
1.2.4.	Mesure de la production des FRO du sang total, des monocytes et des neutrophiles isolés du sang humain.....	32
1.2.5.	Mesure de la production des FRO par les neutrophiles humains stimulés ou non par le fMLF ou le PMA.....	33

1.2.6.	Etude de la viabilité des neutrophiles en présence des polysaccharides extraits d'Anvillea garcinii et de Zygothallum gaetulum	33
1.2.7.	Mesure de la production d'anion superoxyde	33
1.2.8.	Evaluation de l'activité scavenger de H ₂ O ₂	34
1.2.9.	Evaluation de l'activité scavenger de l'anion superoxyde	34
1.2.10.	Translocation de PKC β and p47phox vers la membrane plasmique des neutrophiles en réponse au PMA	34
1.2.11.	Effet de Anv et Zyg sur la phosphorylation de la Ser328 de la p47phox, de ERK (1/2) et de p38 MAPKinase des neutrophiles en réponse au PMA	35
1.2.12.	Effet des polysaccharides extraits d'Anvillea garcinii et de Zygothallum gaetulum sur la dégranulation des neutrophiles	36
1.2.13.	La mesure de calcium intracellulaire	37
1.2.14.	SDS-PAGE et Western Blot	37
1.2.15.	Analyse statistique	38
2.	RESULTATS	39
2.1.	Description des deux plantes étudiées	39
2.1.1.	Zygothallum gaetulum	39
2.1.2.	Anvillea garcinii	40
2.2.	Extraction des polysaccharides solubles à l'eau chaude	41
2.3.	Effet anti-inflammatoire des polysaccharides extraits d'Anvillea garcinii et de Zygothallum gaetulum	41
2.4.	Effet des extraits polysaccharidiques sur la production des FRO par le sang humain total et les phagocytes humains	44
2.5.	Effet des extraits polysaccharidiques sur la production des FRO par les neutrophiles humains	47
2.6.	Effet des polysaccharides extraits d'Anvillea garcinii et de Zygothallum gaetulum sur la viabilité des neutrophiles humains	47
2.7.	Effet des polysaccharides extraits d'Anvillea garcinii et de Zygothallum gaetulum sur la production d'anions superoxydes par le neutrophile humain	50
2.8.	Evaluation de l'activité « scavenger » de l'H ₂ O ₂	50
2.9.	Evaluation de l'activité « scavenger » de l'anion superoxyde	52

2.10.	Effet des polysaccharides extraits d' <i>Anvillea garcinii</i> et de <i>Zygophyllum gaetulum</i> sur la translocation des PKC β and p47phox vers la membrane du neutrophile en réponse au PMA	54
2.11.	Effet des polysaccharides extraits d' <i>Anvillea garcinii</i> et de <i>Zygophyllum gaetulum</i> sur la phosphorylation de la Ser328 de la p47phox	56
2.12.	Effet des polysaccharides extraits d' <i>Anvillea garcinii</i> et de <i>Zygophyllum gaetulum</i> sur la phosphorylation de ERK (1/2) et p38 MAPKinase de neutrophiles stimulés par le PMA	58
2.13.	Effet des polysaccharides extraits d' <i>Anvillea garcinii</i> et de <i>Zygophyllum gaetulum</i> sur la dégranulation des neutrophiles.....	60
2.14.	Mesure de la libération du calcium intracellulaire dans le neutrophile stimulé par le fMLF	63
3.	DISCUSSION GENERALE	64
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	72
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	74

Annexe

INTRODUCTION

La génération des formes réactives de l'oxygène (FRO) et la libération des protéines antibactériennes par les phagocytes sont essentielles pour une défense antimicrobienne efficace de l'hôte. Malheureusement, leur production et leur libération inappropriées peuvent perturber l'équilibre redox cellulaire et endommager les tissus environnants, contribuant ainsi à plusieurs maladies inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires de l'intestin (Wright *et al.*, 2010). Les cellules principales productrices des FRO sont les phagocytes (neutrophiles et monocytes) qui jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes microbiens et dans les réactions inflammatoires (Babior, 1999 ; Nauseef, 2007). En réponse à des agents stimulants tels que le peptide bactérien *N*-formyl-méthionyl-leucylphenyl-lalanine (fMLF), les phagocytes libèrent de grandes quantités de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), espèce réactive primaire à partir de laquelle les autres FRO sont générées (Babior, 1999) tel le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), utilisé par la myéloperoxydase (MPO) pour produire un oxydant puissant et toxique l'acide hypochlorhydrique (HOCl) (Lemanske et Busse, 1997; Klebanoff, 2005; Nauseef, 2007), au cours d'un phénomène appelé l'explosion oxydative. La Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oxydase ou NOX2 est l'enzyme responsable de la production de l'anion superoxyde par les phagocytes, elle est constituée de deux protéines membranaires, gp91PHOX et p22PHOX formant le flavocytochrome b558, et de sous-unités cytosoliques régulatrices (p40PHOX, p47PHOX, p67PHOX et Rac1/2 (un petit GTPase) (Vignais, 2002; El-Benna *et al.*, 2005; El-Benna *et al.*, 2009). L'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles (PMN) est étroitement régulée, ses composantes sont séparées entre compartiments cellulaires veillant à ce qu'elle reste inactive en l'absence de stimulation. La stimulation des neutrophiles induit la translocation des sous-unités cytosoliques vers le complexe membranaire pour former l'enzyme active (Nauseef, 2004). La phosphorylation de la p47PHOX est un évènement crucial pour l'activité de la NADPH oxydase dans les neutrophiles humains (El Benna *et al.*, 1994; El Benna *et al.*, 1996a). Les neutrophiles actifs et les produits associés comme les FRO, la MPO, l'élastase et les adipokines inflammatoires ont été trouvés dans le liquide synovial des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde (El-Benna *et al.*, 2002; Chedid *et al.*, 2012). Les neutrophiles sont des cellules très mobiles qui contiennent beaucoup de granules sécrétoires. La dégranulation, un mécanisme indépendant de la production des FRO, peut également être incriminée comme étant une cause principale

des troubles pulmonaires tels que l'asthme (Lacy, 2006). Ainsi, l'inhibition de la production excessive d'oxydant et de la dégranulation représentent une cible thérapeutique importante et pourrait expliquer en partie les effets bénéfiques de certains produits naturels utilisés contre les troubles inflammatoires. Les polysaccharides isolés à partir de plantes médicinales ont attiré beaucoup d'attention en raison de leur large spectre de propriétés thérapeutiques et leur toxicité relativement faible (Schepetkin et quin, 2006). Dans ce contexte, nous avons étudié les extraits de polysaccharides de deux plantes endémiques qui poussent en Afrique du Nord et en particulier au Maroc et en Algérie, *Zygophyllum gaetulum* et *Anvillea garcinii*. Ces plantes sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs effets anti-diabétique, inflammatoire antiseptique, antispasmodique et anti-inflammatoire, mais seulement quelques travaux ont étudié leur mécanisme d'action (Hammiche et Maiza, 2006).

Dans la présente étude, nous avons fixé comme objectif d'étudier l'activité anti-inflammatoire des polysaccharides extraits de *Zygophyllum gaetulum* et d'*Anvillea garcinii* *in vivo* dans un modèle d'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Outre cette étude *in vivo*, l'effet des extraits sur les fonctions du neutrophile humain, en particulier la production d'anions superoxydes et la dégranulation, est étudié afin d'expliquer leur pouvoir anti-inflammatoire.

Ce manuscrit est organisé en deux grandes parties. La première partie présente l'essentiel des données bibliographiques en relation avec ce travail. La seconde partie renferme l'ensemble des travaux de recherche réalisés, les résultats obtenus ainsi que leur discussion et enfin on termine par une conclusion générale et des perspectives.

1. L'inflammation

L'inflammation est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression qui entraîne une altération tissulaire. Elle peut être déclenchée par un traumatisme, une brûlure, une irradiation ou par la pénétration d'agents pathogènes extérieurs (Schoroderet, 1992). La fonction principale de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus (Weill *et al.*, 2003). L'inflammation de courte durée dite inflammation aiguë est un phénomène bénéfique pour l'organisme qui lui permet de retrouver son intégrité physiologique. 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 Batteux, 2003).

Dans la réaction inflammatoire aiguë, il existe une orchestration 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. Ce type d'inflammation qui dure de quelques jours à quelques semaines est caractérisé par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Botting et Botting, 2000).

2. Le polynucléaire neutrophile

2.1. Description

Les polynucléaires neutrophiles (PN), encore appelés leucocytes polymorphonucléaires (PMN), sont de véritables phagocytes professionnels, caractérisés par un noyau polylobé et un cytoplasme riche en granulations (Borregaard et Cowland, 1997) (**Figure 1**). Ils sont générés en grand nombre par la moelle osseuse à partir d'un progéniteur commun aux cellules mononucléaires et granulocytaires (Abbas *et al.*, 2012). En l'absence de stimulation, les PN entrent en apoptose et sont phagocytés par les macrophages résidants dans le foie ou la rate. Par contre, suite à l'agression de l'organisme par divers agents pathogènes ayant réussi à franchir les barrières cutanéomuqueuses, les PN sont les premières cellules à quitter la circulation sanguine pour rejoindre le tissu où se trouve le site de l'agression afin d'exercer leurs fonctions microbicides et cytotoxiques pour débarrasser l'organisme des

agents envahisseurs (Caruso *et al.*, 2012). Ces fonctions du neutrophile en font un pivot de l'immunité innée et un puissant système de défense de l'organisme contre les agents pathogènes (Gougerot-Pocidalò, 2012). Le cytoplasme du neutrophile contient une myriade de substances protéolytiques et microbicides préformées durant sa maturation et stockées dans différents types de granules (**Figure 1**).



Figure 1. Neutrophile au repos sous microscope électronique à transmission, (Witko-Sarsat *et al.*, 2012).

granules primaires: pg, granules secondaires: sg, Noyau: N, centriole: ce, mitochondrie: m.

2.2. Production des polynucléaires neutrophiles

La production des PN's connue sous le nom de granulopoïèse est quantitativement l'activité majeure de la moelle osseuse (Borregaard, 2010). Comme toutes les cellules sanguines, les PN's dérivent d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente nommée « High Proliferative Potential-Colony Forming Cell » (HPP-CFC) pourvue d'une forte capacité d'auto-prolifération et de différenciation. Sous l'action de différentes cytokines et de facteurs de différenciation, la HPP-CFC donne naissance à une cellule souche myéloïde multipotente qui sous l'effet du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) se différencie en un progéniteur commun des granulocytes et des monocytes (Abbas *et al.*, 2012). Sous l'influence de différents facteurs de différenciation, comme le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), les cellules orientées vers la voie granulocytaire suivent successivement le stade de myéloblaste, promyélocyte, métamyélocyte, granulocyte non segmenté puis neutrophile mature (Kantari *et al.*, 2008).

La production des granules semble suivre également la voie de différenciation du granulocyte (Borregaard et Cowland, 1997). Les granules azurophiles ou primaires émergent en premier lieu durant le stade de promyélocyte et comportent la myéloperoxydase, des

sérines protéases ainsi que des protéines antibiotiques. Au stade de métamyélocyte, apparaissent les granules spécifiques suivis par les granules tertiaires riches en gélatinases. Les vésicules sécrétoires, le quatrième type de granules du neutrophile, apparaissent au stade de neutrophile mature (Kantari *et al.*, 2008, Borregaard, 2010).

Lorsque les macrophages et les cellules dendritiques phagocytent les PN apoptotiques dans les tissus, leur production en IL-23 diminue (von Vietinghoff et Ley, 2009; (Borregaard, 2010). L'IL-23 stimule la production de l'IL-17A par les cellules T spécialisées désignées collectivement sous le nom de Cellules T régulatrices du neutrophile, largement localisées dans les ganglions lymphatiques mésentériques (Ley *et al.*, 2006). Il se trouve que l'IL-17A est un important stimulateur de la production du G-CSF (Schwarzenberger *et al.*, 2000). Ainsi la production du G-CSF est réduite lorsque le nombre de PN dans les tissus augmente (Borregaard, 2010).

2.3. Granulations cytoplasmiques du neutrophile

La plupart des étapes d'activation et d'exécution des fonctions cytotoxiques du neutrophile impliquent la mobilisation des différentes populations de granulations cytoplasmiques. 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 formes réactives de l'oxygène, mais aussi en divers récepteurs membranaires, molécules d'adhésion, protéines de matrice extracellulaire ainsi que de médiateurs solubles de l'inflammation (Fauschou et Borregard, 2003) (Tableau 1).

Les granules du neutrophile sont classés en 4 types distincts en se basant sur la présence de protéines caractéristiques : les granules azurophiles ou primaires (riches en myéloperoxydase : MPO), les granules spécifiques ou secondaires (riches en lactoferrine), les granules tertiaires (riches en gélatinases) et les vésicules sécrétoires (riches en albumine). Cette distinction reflète non seulement des différences dans le contenu des granules mais aussi des différences dans l'ordre de leur mobilisation avec les derniers granules formés qui sont mobilisés en premier lieu, créant cette hiérarchisation de leur exocytose. L'empaquetage des protéines dans ces granules ne s'effectue pas au hasard, mais ces granules sont remplis par des protéines synthétisées simultanément (Gullberg *et al.*, 1999 ; Theilgaard-Mönch *et al.*, 2005; Borregaard, 2010). Les vésicules sécrétoires sont des vésicules exocytiques qui apparaissent au stade de granulocyte segmenté et qui comportent des protéines plasmatiques leur suggérant une origine endocytaire (Fauschou et Borregard, 2003).

2.3.1. Granules primaires ou azurophiles

Les granules primaires ou azurophiles, ainsi nommés car ils présentent une bonne affinité pour le colorant Azure A, comportent une large gamme de peptides et de protéines destinés à la destruction et à la digestion des agents phagocytés (Segal, 2005) (Tableau 1). Les granules azurophiles sont considérés comme des granules sécrétoires régulés plutôt que des lysosomes spécialisés car ils n'expriment pas les protéines LAMP1 et LAMP2 (Lysosomal-Associated Membrane Protein) et ne nécessitent pas la présence de récepteurs mannose 6-phosphate (Faurischou et Borregard, 2003). Les granules azurophiles sont caractérisés par la présence de la MPO qui est une hémoprotéine microbicide qui utilise le H₂O₂ comme substrat pour donner naissance à d'autres dérivés pro-oxydants encore plus toxiques. Trois sérines protéases neutres appelées Ser-procidine (la protéinase-3, la cathepsine G et l'élastase) font aussi partie des protéines matricielles des granules azurophiles et présentent une forte activité microbicide (Tableau1) (Sinha *et al.*, 1987 ; Campanelli *et al.*, 1990). Les α -défensines, constituants majeurs des granules azurophiles tardifs, interviennent dans la régulation de la réparation tissulaire (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Les granules azurophiles subissent une exocytose limitée en réponse aux stimulations du neutrophile (Sengelov *et al.*, 1993), et il semblerait que ces granules contribuent principalement à la destruction et à la dégradation du microorganisme qui a lieu au niveau du phagolysosome (Joiner *et al.*, 1989).

2.3.2. Granules spécifiques ou secondaires

Les granules spécifiques constituent, avec les granules à gélatinase, le groupe des granules peroxydase-négatifs (pour l'absence de la MPO) (Tableau 1). Les constituants connus des granules spécifiques incluent plusieurs protéines et peptides antimicrobiens potentiels dont la lactoferrine qui fait partie de la famille des transferrines et exerce son pouvoir microbicide envers un large spectre de bactéries Gram (+) et (-) en séquestrant le Fer nécessaire à la croissance bactérienne et en se liant aux membranes des cellules bactériennes pour y induire des lésions irréversibles conduisant à la lyse cellulaire (Segal, 2005). La lipocaline NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) est une protéine antimicrobienne des granules spécifiques qui joue un rôle important dans la stratégie de l'immunité innée par déplétion des ions Fer (Friedl *et al.*, 1999 ; Borregaard *et al.*, 2007), tout comme hCAP-18 (Human Cathelicidin Antimicrobial Protein) qui possède un pouvoir antibactérien envers les bactéries Gram + et - (Turner *et al.*, 1998). Le lysozyme est aussi un peptide antimicrobien cationique qui se trouve dans les 4 types de granules du PN avec une

Tableau 1. Contenu des granulations du PN (Gougerot-Pocidallo *et al.*, 2006).

Granulations azurophiles	Granulations spécifiques	Gélatinase	Vésicules sécrétoires
Membrane CD63 CD68 V-type H ⁺ -ATPase	Membrane CR3 (CD11b/CD18) CD15 structure CD66 CD67 Cytochrome b558 FMLP-R Fibronectine-R G-protéine α -sous-unité Laminine-R NB 1 antigène 19kD-protéine 155kD protéine Rap1, Rap2 SCAMP Thrombospondine-R TNF-R UPAR VAMP-2 Vitronectine-R	Membrane CR3(CD11b/CD18) Cytochrome b558 DAG-deacylating enzyme FMLP-R SCAMP UPAR VAMP-2 V-typeH ⁺ -ATPase	Membrane Phosphatase alcaline CR1 (CD35) Cytochrome b558 CD11b CD14 CD16 FMLP-R SCAMP UPAR V-typeH ⁺ -ATPase VAMP-2 C1q-R DAF CD10, CD13, CD45
Matrice Glycérophosphatase acide Mucopolysaccharide α 1-Antitrypsine α -mannosidase Azurocidine/CAP37 Bactericidal permeability increasing protein (BPI) β -Glycerophosphatase β -Glucuronidase Cathepsines Défensines α Elastase Lysosyme Myéloperoxydase N-acétyl- β glucosaminidase Protéinase 3 Sialidase Ubiquitine-protéine	Matrice β 2-Microglobuline Collagénase Gélatinase hCAP-18 Histaminase Héparanase Lactoferrine Lysosyme NGAL Urokinase-type Plasminogène activateur Sialidase SGP28 Vit B12-binding protein	Matrice Acétyl-transférase β 2-Microglobuline Gélatinase Lysosyme	Matrice Tétraneactine

concentration maximale dans les granules spécifiques (Lollike *et al.*, 1995; Takada *et al.*, 1994). Les granules spécifiques comprennent également dans leur matrice des métalloprotéinases (Tableau 1) nommées MMP (Matrix Metalloproteinase) comme la collagénase ou MMP-8 et les leukolysines ou MMP-25 (Borregaard, 2007). Ces métalloprotéinases joueraient un rôle essentiel dans la dégradation de la membrane basale de la paroi vasculaire ainsi que des structures interstitielles lors de l'extravasation et la migration du neutrophile. Les granules spécifiques comportent également des molécules d'adhésion comme les β 2-intégrines (CD11b/CD18), des récepteurs pour les éléments de la matrice extracellulaire (Fibronectin-R, Laminin-R, vitronectin-R), des récepteurs pour les chimioattractants comme le récepteur au peptide bactérien formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) appelé FPR ainsi que le cytochrome b₅₅₈, le composant membranaire

du complexe NADPH oxydase générateur des espèces réactives de l'oxygène lors de la phagocytose (Faurischou et Borreggard, 2003).

2.3.3. Granules à gélatinase ou tertiaires

Les granules peroxydase-négatifs qui sont dépourvus de lactoferrine et riches en gélatinases, constituent la population des granules à gélatinase ou granules tertiaires (Tableau 1). Ces granules apparaissent sont plus petits que les granules spécifiques. Ils sont considérés comme un réservoir d'enzymes dégradant les éléments de la matrice extracellulaire et de récepteurs membranaires facilitant l'extravasation et la migration interstitielle du neutrophile activé (Borregaard et Cowland, 1997; Faurischou et Borreggard, 2003). Les granules à gélatinase comportent des protéines antimicrobiennes comme le lysozyme ou encore la protéine Nramp1 (Natural resistance-associated macrophage protein 1). Après dégranulation, Nramp1 transloque au niveau de la membrane du phagosome où elle contribue à la privation du microorganisme phagocyté d'ions tels que les ions Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} (Faurischou et Borreggard, 2003; Borregaard, 2010). Comme les granules spécifiques, les granules à gélatinase renferment également dans leurs membranes des molécules d'adhésion comme les $\beta 2$ -intégrines (CD11b/CD18), des récepteurs pour les chimioattractants comme le FPR ainsi que le cytochrome b_{558} (Faurischou et Borreggard, 2003).

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 phases précoces de la réponse inflammatoire (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Ces vésicules qui comportent des protéines plasmiques (Borregaard, 2010) sont les derniers granules à être formés lors de la granulopoïèse mais les premiers mobilisés lors de l'activation du neutrophile (Häger *et al.*, 2010). En effet, extrêmement sensibles aux stimulations, les vésicules sécrétoires sont très facilement exocytées en réponse à une vaste gamme de stimuli impliqués dans l'interaction du neutrophile avec l'endothélium activé comme les sélectines et leurs ligands ou par les chimiokines comme l'IL-8 ou encore par le fMLF. La membrane de ces vésicules est riche en $\beta 2$ -intégrine (Sengelov *et al.*, 1993), en récepteurs du complément (CR1) (Sengelov *et al.*, 1994), en récepteurs FPR (Sengelov *et al.*, 1995), en récepteurs des LPS/acide lipoteichoïque (Detmers *et al.*, 1995), en $Fc\gamma III R$ (Detmers *et al.*, 1995) ainsi qu'en leukolysine (Kang *et al.*, 2001). De cette manière, la mobilisation des vésicules sécrétoires

fournit au neutrophile une surface membranaire avec des récepteurs et des protéines fonctionnelles nécessaires à sa transmigration et ce, sans libération des substances nocives susceptibles de causer des dommages tissulaires inutiles (Borregaard, 2010).

2.4. Fonctions des polynucléaires neutrophiles

Le rôle pertinent des PN dans la défense antimicrobienne 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 PN tels que la granulomatose septique chronique (ou Chronic Granulomatous Disease : CGD), le déficit d'adhésion leucocytaire (ou Leucocyte Adhesion Deficiency: LAD) ou encore le déficit en granules spécifiques (SGD) (Häger *et al.*, 2010).

La réponse du neutrophile peut être considérée comme un processus à plusieurs étapes impliquant l'adhésion des PN circulants à l'endothélium vasculaire activé, leur diapédèse et extravasation subséquentes vers le milieu interstitiel suivie par leur migration vers le site inflammatoire puis l'élimination *in situ* de l'agent à l'origine de l'inflammation par phagocytose. Celle-ci est caractérisée par la libération du contenu microbicide des granules cytoplasmiques (dégranulation) et génération des FRO par le complexe NADPH oxydase, un processus appelé flambée respiratoire ou explosion oxydative (Faurichou et Borregaard, 2003). En 2004, une autre activité antimicrobienne des PN a été décrite qui consiste à émettre un maillage fait de fibres de chromatine entourées de protéines antimicrobiennes dérivées de leurs granules comme la MPO ou les cathépsine G. Ces structures appelées NETs (Neutrophil Extracellular Traps) seraient une stratégie de défense post-mortem déployée par le neutrophile (Kaplan et Radic, 2012). En effet, le retour à un état d'homéostasie et la protection des tissus implique une phase de résolution qui se traduit par la diminution du recrutement des PN vers le site inflammatoire ainsi que l'induction de leur apoptose et leur élimination par les macrophages (Gougerot-Pocidallo, 2012).

2.4.1. Recrutement et migration vers le foyer inflammatoire

Le processus recrutement des PN circulants vers le site de l'agression comporte une séquence d'évènements où les PN 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 (**Figure 2**) (Borregaard, 2010).

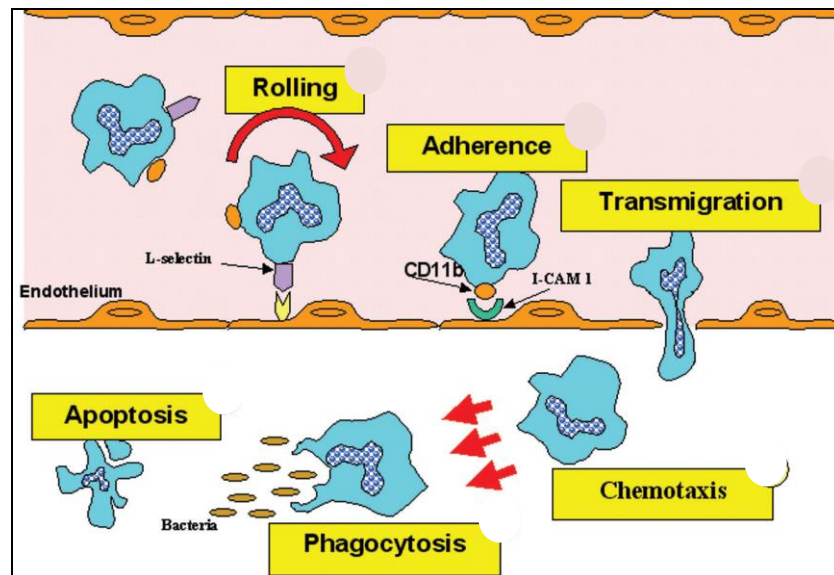


Figure 2. La cascade d'adhésion et de recrutement des neutrophiles (Seely *et al.*, 2003).
ICAM, intercellular adhesion molecule.

En réponse aux pathogènes envahissants, les macrophages et mastocytes résidents du tissu sécrètent le TNF (tumor necrosis factor), l'interleukine-1 β (IL-1 β) et plusieurs autres cytokines qui activent les cellules endothéliales. Ces cellules expriment alors des molécules d'adhésion et capturent les PN circulants (Schramm et Thorlacius, 2004; Scher *et al.*, 2010; Kolaczowska *et al.*, 2013). Les PN sont capturés par l'intermédiaire des sélectines qui activent les PN, les polarisent et induisent l'externalisation des CD11a et CD18 contenus dans les réserves intracellulaires (Nauseef et Borregaard, 2014). Le débit sanguin ralenti suite à la vasodilatation facilite l'interaction neutrophile-endothélium via les P- et L-sélectines sur les PN et les E-sélectines sur les cellules endothéliales. Cette interaction étant réversible et transitoire fait que le neutrophile se déplace en roulant le long de la surface endothéliale (Scher *et al.*, 2010).

La liaison des intégrines aux ICAMs résulte en l'arrêt des PN et leur adhésion ferme aux cellules endothéliales et dirige le mouvement des PN vers la traversée de l'endothélium par diapédèse (ou extravasation) par voie paracellulaire (entre cellules) ou transcellulaire (à travers la cellule endothéliale adjacente) (Borregaard, 2010; Kolaczowska *et al.*, 2013). La diapédèse requiert l'interaction entre les molécules de CD31 (exprimées par les PN et aussi par les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales) qui permet aux PN de traverser l'endothélium (Muller *et al.*, 1993). La sécrétion des MMPs dégrade la membrane basale et permet aux neutrophiles de tracer leur chemin à travers la matrice extracellulaire. Les MMPs peuvent également améliorer la migration dirigée des neutrophiles en générant les fragments

de collagène à propriétés chimiotactiques (Wolf et Friedl, 2011). 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). Le mécanisme du chimiotactisme implique, en partie, une localisation dirigée des récepteurs de chimioattractants au bord frontal du neutrophile, et des réarrangements du cytosquelette permettant une motion unidirectionnelle. Un des chimioattractants les plus puissants des neutrophiles est l'interleukine-8 (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 (Kobayashi *et al.*, 2005). Les bactéries produisent aussi des molécules qui recrutent directement les PMN (comme les peptides *N*-formylés) (Showell *et al.*, 1976; Schmeling *et al.*, 1979). Le processus de migration altère l'état fonctionnel du neutrophile; les neutrophiles tissulaires exhibent une activité NADPH oxydase augmentée en réponse aux agonistes comme les peptides formylés, produisent plus de cytokines pro-inflammatoires et deviennent plus résistants aux stimulations anti-apoptotiques (Kuhns et Gallin, 1995; Christenson *et al.*, 2011; Nauseef *et al.*, 2014).

2.4.2. La dégranulation

A fur et à mesure que le neutrophile poursuit son activation, ses granules sont mobilisés et fusionnent soit avec la membrane plasmique soit avec le phagosome. Dans les deux cas, la membrane des granules devient une partie permanente de la membrane cible altérant ainsi sa composition moléculaire (Borregaard *et al.*, 1997). 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). Après le contact neutrophile-endothélium, la stimulation via les sélectines et les chimioattractants induit la mobilisation des vésicules sécrétoires dont la membrane est riche en récepteurs et molécules d'adhésion, ce qui favorise l'adhésion ferme médiée par les β 2-integrines. A fur et à mesure que le neutrophile traverse l'endothélium, il reçoit davantage de signaux d'activation qui initient la mobilisation des granules à gélatinase et donc la libération des MMPs qui permettent au PN de traverser la membrane basale. Arrivant au site de l'inflammation, l'activation complète du neutrophile s'ensuit, incitant l'explosion oxydative et la mobilisation des granules spécifiques et azurophiles. La fusion de ces granules avec le phagosome déclenche les mécanismes de bactéricidie et contribue à la création d'un environnement antimicrobien inhospitalier aux pathogènes envahissants.

La régulation des taux de calcium intracellulaire semble jouer un rôle important dans la mobilisation différentielle des granules du neutrophile (Sengelov *et al.*, 1993). Les granules spécifiques à gélatinase et les vésicules sécrétoires sont plus sensibles, et se mobilisent plus facilement que les granules azurophiles en réponse aux stimuli chimiotactiques et à l'élévation du Ca²⁺ intracellulaire (Borregaard *et al.*, 1993; Sengelov *et al.*, 1993). L'élévation des concentrations cytosoliques du Ca²⁺ est induite par divers stimuli incluant l'engagement des L-sélectines, des CD11b/CD18 et du récepteur fMLF (Ng-Sikorski *et al.*, 1991; Sengelov *et al.*, 1993 ; Laudanna *et al.*, 1994). L'engagement des β -2 intégrines induit l'activation des tyrosines kinases (Fuortes *et al.*, 1993; Berton *et al.*, 1994), qui phosphorylent et activent des protéines comme la phospholipase C γ 2 et la phospholipase D (Bradford et Rubin, 1986; Agwu *et al.*, 1989; Fallman *et al.*, 1992; Suchard *et al.*, 1994; Hellberg *et al.*, 1996; Berton et Lowell, 1999). Le rôle des PKC dans la régulation de la dégranulation dans le neutrophile a été démontré par l'utilisation d'activateurs non-physiologiques de la PKC, comme le Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) qui provoquent la libération des granules spécifiques (Esaguy *et al.*, 1991; Zaman *et al.*, 1994). Le PMA n'affecte pas les niveaux basaux du Ca²⁺ intracellulaire même à des concentrations élevées (Pontremoli *et al.*, 1986). Le neutrophile humain exprime différentes isoformes de PKC (α , β I, β II, δ , et ζ) (Smallwood et Malawista, 1992; Kent *et al.*, 1996) dont trois semblent avoir des rôles plus ou moins importants dans la dégranulation. Dans les neutrophiles isolés de souris knock-out pour le gène de PKC- δ , une réduction importante de la libération de lactoferrine en réponse au fMLF ou au PMA est observée (Chou *et al.*, 2004). Popa-Nita *et al.* (2009) ont montré l'implication des isoformes classiques des PKC (cPKC) dans la dégranulation induite par les cristaux d'urate, et ont démontré une translocation à la membrane des isoformes classiques α et β après activation des neutrophiles par ces cristaux *in vitro*. Bien que la dégranulation induite par le fMLF ou le leucotriène B4 (LTB4) soit réduite par l'inhibiteur des PKC, K252a, l'exocytose des granules en réponse au zymosan opsonisé n'en est que marginalement sensible (Smith *et al.*, 1988; Nagaji, 1999). Le rôle des PKC serait donc d'améliorer la réponse sécrétoire plutôt que l'induction de la fusion exocytique (Kim *et al.*, 2003; Lacy, 2005; Efimov *et al.*, 2008).

2.4.3. Phagocytose et mécanismes de bactéricidie

La phagocytose est initiée par la reconnaissance des PAMPs microbiens par les TLRs (Toll like receptors) (Ozinsky *et al.*, 2000; Underhill et Ozinsky, 2002) et d'autres PRRs

exprimés par le neutrophile. L'engagement des TLRs, en particulier TLR2 et 4, active des voies de signalisation qui prolongent la survie cellulaire, facilitent l'adhésion (Sabroe *et al.*, 2003) et la phagocytose (Hayashi *et al.*, 2003), induisent la libération des cytokines, des chimiokines et des FRO (Kurt-Jones *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Sabroe *et al.*, 2003) et promeuvent la dégranulation (Bellocchio *et al.*, 2004; Lotz *et al.*, 2004) contribuant ainsi à l'activité microbicide des neutrophiles. Quoique les PRRs jouent un rôle important dans la reconnaissance des microbes, l'efficacité de la phagocytose est nettement améliorée par l'opsonisation des pathogènes par les immunoglobulines et les fragments C3b du complément. L'opsonisation des bactéries par les immunoglobulines joue un rôle particulier dans la réponse des neutrophiles aux bactéries encapsulées comme leur capsule les aide à évader la phagocytose directe (Ravetch et Kinet, 1991).

Le PN détruit les pathogènes par divers mécanismes qui impliquent la fusion des granules cytoplasmiques, la production des formes oxygénées toxiques, l'activation des enzymes protéolytiques et l'activité des protéines antimicrobiennes (**Figure 3**) (Scher *et al.*, 2010). Le neutrophile utilise deux mécanismes principaux, dépendants et indépendants de l'O₂, pour tuer les microbes ingérés. Le mécanisme prédominant dépend de l'espèce microbienne et du microenvironnement métabolique (aérobie ou anaérobie) (Rosen et Michel, 1997).

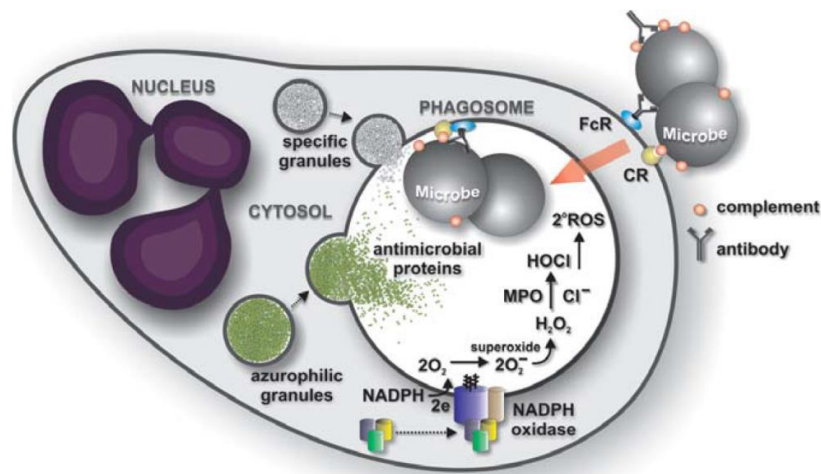


Figure 3. Phagocytose et activation des mécanismes de bactéricidie du neutrophile (Kobayashi *et al.*, 2005).

Le mécanisme dépendant de l'oxygène repose sur la production rapide des formes réactives de l'oxygène, appelé « explosion oxydative », en réponse à divers stimuli inflammatoires. Ce phénomène, accompagné d'une augmentation de la consommation de l'oxygène, permet la réduction de l'O₂ en O₂⁻ à travers l'activation d'un système

enzymatique unique aux cellules phagocytaires : la NADPH oxydase (Cassatella, 2010). Une fois libéré dans le phagosome, le $O_2^{\cdot-}$ est converti par la (superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 qui, en présence des ions Cl^- , est métabolisé par la myéloperoxydase du neutrophile en acide hypochloreux (HOCl) qui détient un fort potentiel antimicrobien (Hampton *et al.*, 1998). Le $O_2^{\cdot-}$ peut également être converti en d'autres formes réactives à propriété microbicide comme le radical hydroxyle et l'oxygène singulet (Klebanoff, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005), comme il peut servir de substrat aux réactions avec les autres radicaux. Par exemple, l' $O_2^{\cdot-}$ peut réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxy-nitrite hautement réactif et cytotoxique. Dans le phagosome, les concentrations élevées des FRO sont très toxiques et contribuent ultimement à la destruction des microbes phagocytés (Cassatella, 2010).

Le mécanisme de bactéricidie dit « indépendant de l'oxygène » repose sur la libération dans le phagosome d'enzymes de dégradation et de molécules antimicrobiennes contenues dans les granules cytosoliques du neutrophiles (Cassatella, 2010). Bien que les protéines antibactériennes comme les BPI, les défensines et les cathelicidines, soient structurellement différentes, elles sont toutes cationiques. Les charges positives servent probablement à la liaison initiale des microorganismes. Une fois liées, les protéines antimicrobiennes pourraient perturber l'intégrité de la membrane bactérienne (Brinkmann *et al.*, 2007).

2.4.4. Régulation des réponses immunitaires et production de cytokines

le neutrophile contribue au développement et à la régulation fine des réponses immunitaires et inflammatoires. Les FRO dérivés du neutrophile modulent la signalisation intracellulaire, régulant les fonctions des cellules environnantes comme leur apoptose, les réponses prolifératives et la production de cytokines (Droge, 2002). Les neutrophiles produisent de nombreux médiateurs de l'inflammation (Hoesel *et al.*, 2005), ainsi que des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Tecchio *et al.*, 2014). Les neutrophiles sont les premières cellules infiltrant massivement le foyer inflammatoire, suggérant que leur production de cytokines peut être déterminante à ce stade précoce de la réponse immunitaire (Mantovani *et al.*, 2011). Ces molécules coordonnent potentiellement les fonctions précoces des monocytes, macrophages, cellules dendritiques (DC) et lymphocytes. Les neutrophiles produisent le TNF et d'autres cytokines qui induisent l'activation et la différenciation des macrophages et des DCs (Bennouna *et al.*, 2003; Nathan, 2006) et génèrent des chimiokines pour la plupart des cellules immunitaires et en particulier pour les cellules dendritiques

participant de ce fait à l'engagement des réponses immunitaires adaptatives. En outre, les neutrophiles interagissent directement avec les cellules dendritiques leur transférant l'antigène et régulant leur maturation (Nathan, 2006; Mantovani *et al.*, 2011). Il a été montré une certaine capacité de présenter l'antigène par les neutrophiles aux lymphocytes T, notamment par cross-présentation (Beauvillain *et al.*, 2007). Les neutrophiles migrent dans les ganglions lymphatiques et sont donc susceptibles d'interagir avec les cellules immunitaires qui y sont présentes (Gougerot-Pocidalò, 2012). En effet, le neutrophile contribue à la prolifération et à la maturation des lymphocytes B en sécrétant le BLyS (Scapini *et al.*, 2005), ainsi qu'à la différenciation des lymphocytes T et à l'activation des macrophages par sa production d'interféron- γ (Ethuin *et al.*, 2004).

2.4.5. Rôle du neutrophile dans la résolution de l'inflammation

Les neutrophiles sont généralement considérés comme passifs dans la résolution de l'inflammation. Cependant, des études récentes suggèrent leur implication dans l'induction de la résolution à travers la production des médiateurs lipidiques résolutifs (Schwab *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2009; Spite *et al.*, 2009). Durant les phases finales des réponses inflammatoires aiguës, les neutrophiles commutent leur biosynthèse d'eicosanoïdes du leucotriène B₄ (LTB₄) au lipoxine A₄ (LXA₄) qui peut inhiber le recrutement des neutrophiles à travers son interaction avec le récepteur LXA₄R couplé à la protéine G (Serhan *et al.*, 2008). Le rôle des neutrophiles dans la résolution de l'inflammation inclut également le blocage et la séquestration des chimiokines et des cytokines. Les médiateurs lipidiques pro-résolutifs (comme la LXA₄, la résolvine E₁ et la protectine D₁) augmentent l'expression du CCR5 par les neutrophiles apoptotiques qui peuvent donc agir comme pièges fonctionnels du CCL3 et CCL5 (Ariel *et al.*, 2006). De plus, les neutrophiles expriment le récepteur leurre D₆ capable de piéger virtuellement toutes les CC-chimiokines inflammatoires (McKimmie *et al.*, 2008). Les PN produisent des taux élevés du récepteur leurre d'IL-1 type 2 (IL-1R2) dont l'expression est davantage augmentée par les signaux anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes. L'IL-1R2 lie l'IL-1 et empêche son interaction avec son récepteur IL-1R1 (Bourke *et al.*, 2003). Les neutrophiles, particulièrement ceux stimulés par la cytokine anti-inflammatoire IL-10, sont une source majeure de l'antagoniste du récepteur d'IL-1 (IL-1ra) qui rentre en compétition avec l'IL-1 α et l'IL-1 β *vis-à-vis* de leur récepteur, inhibant ainsi leurs activités biologiques (Bazzoni *et al.*, 2010).

Enfin, l'élimination des neutrophiles apoptotiques est une étape importante dans la résolution de l'inflammation. La reconnaissance et l'ingestion des neutrophiles apoptotiques façonne le phénotype fonctionnel des macrophages (Fox *et al.*, 2010). Ces derniers développent un phénotype M2-like IL-10^{hi} IL-12^{low} qui régule négativement l'inflammation et promeut la réparation du tissu (Bystrom *et al.*, 2008; Filardy *et al.*, 2010). Agissant à différents niveaux, les neutrophiles font donc partie du réseau cellulaire orchestrant la résolution de l'inflammation (Mantovani *et al.*, 2011).

2.5. Production des FRO par le neutrophile

Durant la phase effectrice de la réponse inflammatoire, les neutrophiles recrutés au foyer inflammatoire et activés par divers stimuli produisent très rapidement des FRO toxiques via leur NADPH oxydase. Cette production accompagnée d'une augmentation de la consommation d'oxygène est appelée « explosion oxydative » (El Benna *et al.*, 2016). Le superoxyde produit par la NADPH oxydase est converti dans le pH acide du phagosome en H₂O₂. En présence du chlore (Cl⁻), le H₂O₂ est à son tour transformé en acide hypochloreux (HOCl), un puissant agent antimicrobien, par la myéloperoxydase (MPO) libérée dans le phagosome (**Figure 4**). Le HOCl peut à son tour 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, le radical hydroxyle est généré en présence des ions Fe²⁺ et Cu³⁺. Enfin, la réaction entre le H₂O₂ et le HOCl peut générer l'oxygène singulet hautement réactif qui peut attaquer les doubles liaisons (Babior *et al.*, 2002). Le rôle des FRO dérivés de la NADPH oxydase dans la défense antimicrobienne de l'organisme est clairement illustré par infections bactériennes et fongiques récurrentes et mortelles observées chez les personnes atteintes de CGD, un déficit génétique de la NADPH oxydase (Roos *et al.*, 1996).

3. Le complexe NADPH oxydase phagocytaire nox2

Les NADPH oxydases (NOXs) sont des enzymes membranaires qui catalysent le transfert d'un électron du NADPH cytosolique vers l'oxygène moléculaire aboutissant à la production de l'O₂^{•-}, précurseur des autres FRO (Babior, 1999). Initialement, la NADPH

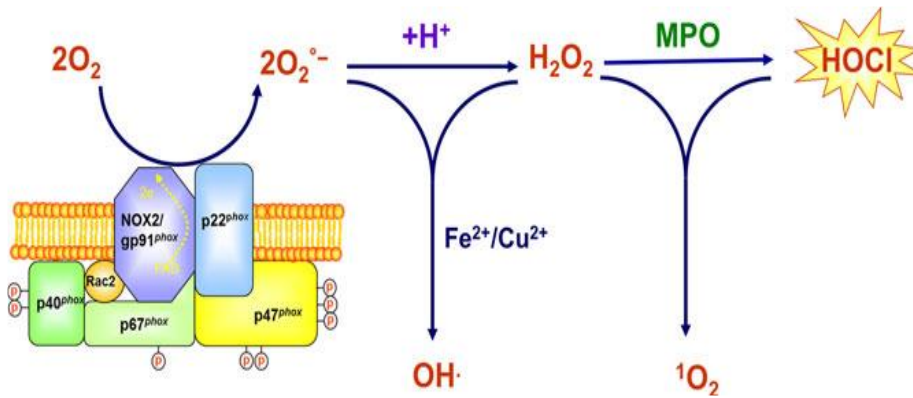


Figure 4. Génération des FRO dans les neutrophils stimulés (El Benna *et al.*, 2016).

Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), Myéloperoxydase (MPO), l'acide hypochloreux (HOCl), le radical hydroxyle (OH•), oxygène singulet (¹O₂)

oxydase semblait être spécifique des phagocytes professionnels dont l'unité catalytique est la gp91^{phox}. Après l'identification de NOX1, un homologue de la gp91^{phox} dans les cellules non phagocytaires, toute une famille de sept membres a été identifiée. Dès lors, la NADPH oxydase phagocytaire et la gp91^{phox} ont été renommées NOX2 (Ago *et al.*, 2011).

L'anion superoxyde produit par NOX2 sert à la production de puissants agents pro-oxydants comme les halogènes oxydés, les radicaux libres et l'oxygène singlet que le phagocyte utilise pour tuer le microorganisme ingéré à l'intérieur du phagosome (El Benna *et al.*, 2010). Cependant, ces FRO produits par les phagocytes professionnels causent aussi d'importants dommages collatéraux aux tissus avoisinants, si bien que leur production doit être finement régulée. Cette régulation de l'activité NADPH oxydase est régie par deux mécanismes: la séparation des composés de l'oxydase en deux localisations subcellulaires différentes au sein du phagocyte au repos (cytosolique et membranaire) et la modulation des interactions réversibles protéine-protéine ou protéine-lipide ainsi que de la phosphorylation de ses sous-unités (Groemping et Rittinger, 2005, El Benna *et al.*, 2009).

3.1. Structure et composants de NOX2

La NADPH oxydase phagocytaire est constitué de 6 protéines dans les cellules au repos : les composants cytosoliques (la p67^{phox}, la p47^{phox}, la p40^{phox} et Rac-GDP) et membranaires (la gp91^{phox} et la p22^{phox} qui forment le cytochrome b₅₅₈) sont dissociés et la NADPH oxydase est inactive. Après stimulation des récepteurs, le trimère cytosolique p67^{phox}-p47^{phox}-p40^{phox} migre vers la membrane pour s'associer au cytochrome b₅₅₈, simultanément Rac échange le GDP contre le GTP et le rejoint à la membrane pour former le complexe NADPH oxydase actif qui catalyse la

formation de l'anion superoxyde dans la cellule à partir de l'oxygène moléculaire (**Figure 5**) (El Benna *et al.*, 2005; Bréchar *et al.*, 2013).

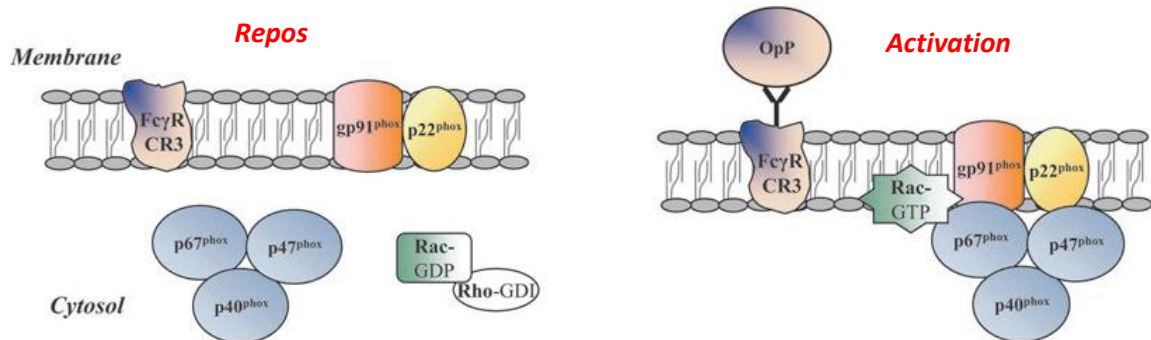


Figure 5. Activation de la NADPH oxydase dans les neutrophiles (Bréchar *et al.*, 2013).

3.2. Activation du complexe NADPH oxydase NOX2

Lors de la phase de recrutement des neutrophiles, le système NADPH oxydase passe graduellement d'un état de repos à un état activé (El Benna *et al.*, 2008). En effet, durant ce passage, le neutrophile exhibe essentiellement trois phénotypes déterminés par les stimuli externes présents. Le premier phénotype connu est celui du neutrophile quiescent circulant librement dans le sang et présentant une morphologie arrondie avec très peu de protubérances (**Figure 6**). Lors d'un épisode inflammatoire, la production de stimuli pro-inflammatoires et de chimiokines (TNF α , GM-CSF, IL-8, LPS...) induit le passage du neutrophile d'un état de quiescence et de non adhérence à un état d'adhérence à l'endothélium vasculaire (**Figure 6**). Le neutrophile entreprend d'abord des interactions de roulement sélectines-dépendantes avec la paroi vasculaire durant lesquelles il subit une pré-activation ou « priming ». Ce priming induit non seulement un changement de la forme du neutrophile et son adhésion à l'endothélium vasculaire, mais le prépare et le rend plus réactif et plus susceptible à une activation par des stimuli secondaires. Ainsi, le priming du neutrophile fait en sorte que son exposition à des médiateurs comme le fMLF induit une réponse plus rapide et plus intense que celle induite par le même stimulus chez le neutrophile au repos (El Benna *et al.*, 2008). Vient ensuite la diapédèse du neutrophile adhérent et sa migration par chimiotactisme en réponse à un gradient de médiateurs chimioattractants qui le mènent directement au niveau du foyer infectieux. Le neutrophile phagocyte alors les microorganismes qui s'y présentent avec l'assemblage et l'activation subséquente de la NADPH oxydase au sein du phagolysosome

(Sheppard *et al.*, 2005). Enfin, l'inactivation de la NADPH oxydase a lieu au niveau du site inflammatoire afin de limiter la production de FRO (El Benna *et al.*, 2008).

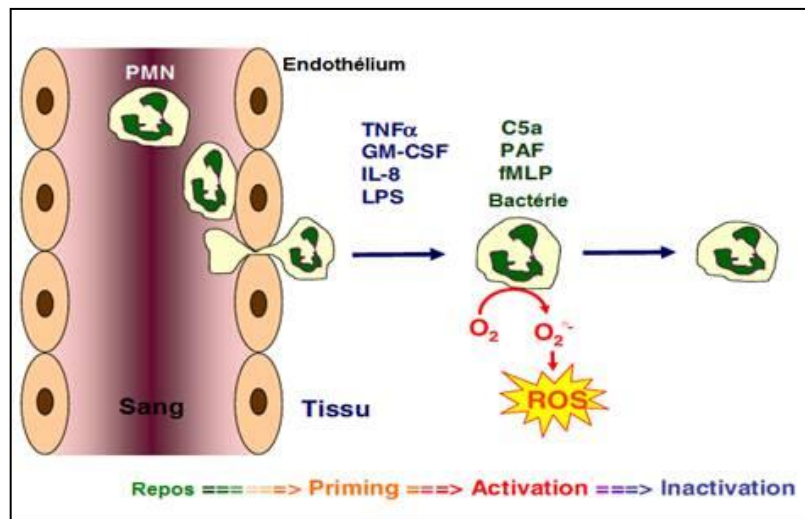


Figure 6. Aperçu schématique des étapes d'activation du neutrophile (El Benna *et al.*, 2008).

3.2.1. La NADPH oxydase au sein du neutrophile au repos

Au sein du neutrophile au repos, les composants cytosoliques et membranaires de la NADPH oxydase sont dissociés permettant de la maintenir dans un état inactif. La membrane plasmique du neutrophile au repos comporte très peu de NOX2 dont la majorité (60 à 70%) est localisée dans la membrane des granules spécifiques (Bokoch et Zhao, 2006; El Benna *et al.*, 2008; El Benna *et al.*, 2016). Les sous-unités cytosoliques, p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} forment un complexe trimoléculaire p40-p47-p67^{phox} dans lequel la p67^{phox} joue le rôle d'adaptateur et de pont entre la p40^{phox} et la p47^{phox} (Groemping *et al.*, 2003). En effet, la p67^{phox} se lie via son domaine SH3 au domaine PRR de la p47^{phox} d'une part, et via son domaine PB1 au domaine PB1 de la p40^{phox}, d'autre part.

Au repos, la p47^{phox} existe également dans le cytosol sous forme monomérique ou complexée à la p67^{phox} formant un dimère équimoléculaire (Dang *et al.*, 2001a; 2003) (**Figure 7**). En l'absence de stimulation, la p47^{phox} n'est pas phosphorylée et se trouve dans le cytosol au repos sous une conformation d'autoinhibition. Dans cette conformation, le tandem SH3 (SH3A et SH3B) interagit avec le domaine d'autoinhibition AIR évitant ainsi la liaison des domaines SH3 de la p47^{phox} au domaine PRR de la p22^{phox}. D'autre part, le domaine SH3A de la p47^{phox} interagit aussi avec le domaine PX prévenant sa liaison aux composants de la membrane et donc le recrutement membranaire de la p47^{phox} qui reste ainsi au cytosol empêchant l'activation inadéquate de la NADPH oxydase (Marcoux *et al.*, 2010).

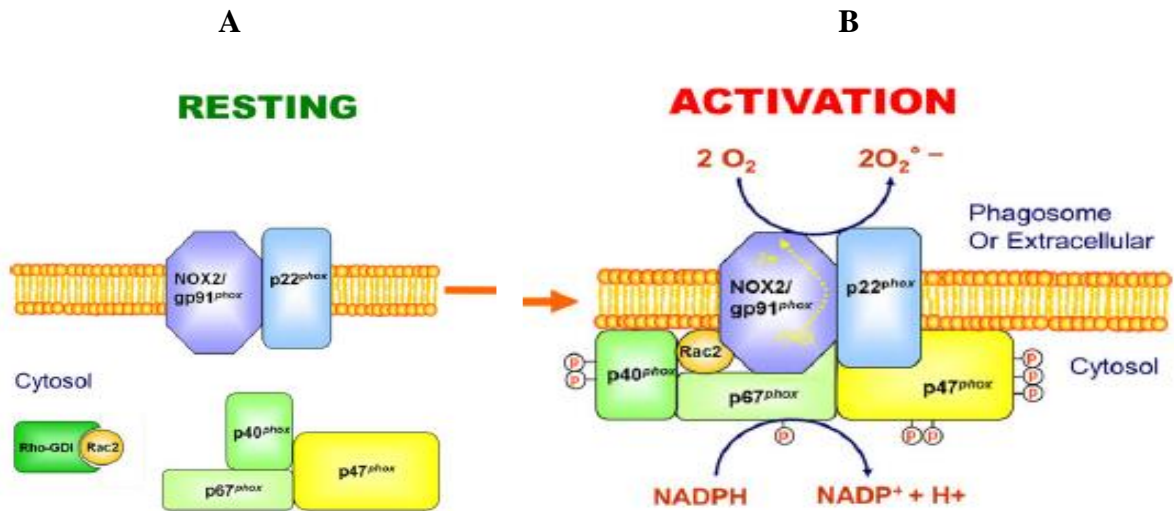


Figure 7. la NADPH Oxydase dans le neutrophile au repos (A) et activé (B) (El Benna *et al.*, 2016).

3.2.2. Activation de la NADPH oxydase du neutrophile stimulé

L'activation de la NADPH oxydase peut être induite par une multitude de facteurs solubles ou particuliers tels que les bactéries opsonisées, le zymosan opsonisé, les particules en latex, le fragment du complément C5a, les peptides formylés (fMLF) (**Figure 8**), le LTB₄, le PAF, le DAG, les calcium ionophores (inomycine) ainsi que les activateurs des PKC comme les esters de phorpol tel que le PMA (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 (Groempping et Rittinger, 2005 ; Sheppard *et al.*, 2005) (**Figure 8**). Dans les conditions physiologiques, cette activation est induite par liaison d'un stimulus à son récepteur spécifique à la surface du PN qui conduit à l'activation des protéines G hétérotrimériques (G $\alpha\beta\gamma$) qui lui est associée. Les protéines G de la classe G α_i (sensibles à la toxine pertussique) sont les plus abondantes au sein du neutrophile et contrôlent la plupart des effets pro-inflammatoires des agents chimioattractants, à l'exception du PAF (Zarbock et Ley, 2011). Une fois activée, la protéine G active va activer à son tour de multiples voies de signalisation intracellulaires impliquant des interactions protéines-protéines ou protéine-lipides réversibles qui conduisent à l'activation de phospholipases et de protéine/lipide kinases (Bréchar d *et al.*, 2013). Par exemple, des enzymes membranaires telles que la phospholipase C (PLC) la phospholipase A₂ (PLA₂) et la PLD activées par la protéine G,

conduisent à la libération de seconds messagers intracellulaires. En effet, la PLC clive le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate membranaire (PIP₂) en DAG et inositol triphosphate (IP₃) (**Figure 8**). L'IP₃ induit la libération du Ca²⁺ intracellulaire des réserves non mitochondriales et le DAG active les isoformes Ca²⁺ dépendantes et indépendantes des PKC. La PLD libère l'acide phosphatidique à partir des phosphatidylcholines, alors que la PLA₂ conduit à la production de l'acide arachidonique utilisé ensuite comme substrat pour la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines. Différentes protéines et lipide kinases sont aussi activées comme les tyrosine kinases, les MAP kinases, les PKC, PKA, PI3kinases qui en retour phosphorylent directement ou conduisent à la phosphorylation de nombreuses protéines y compris les composants de la NADPH oxydase (Bréchar *et al.*, 2013).

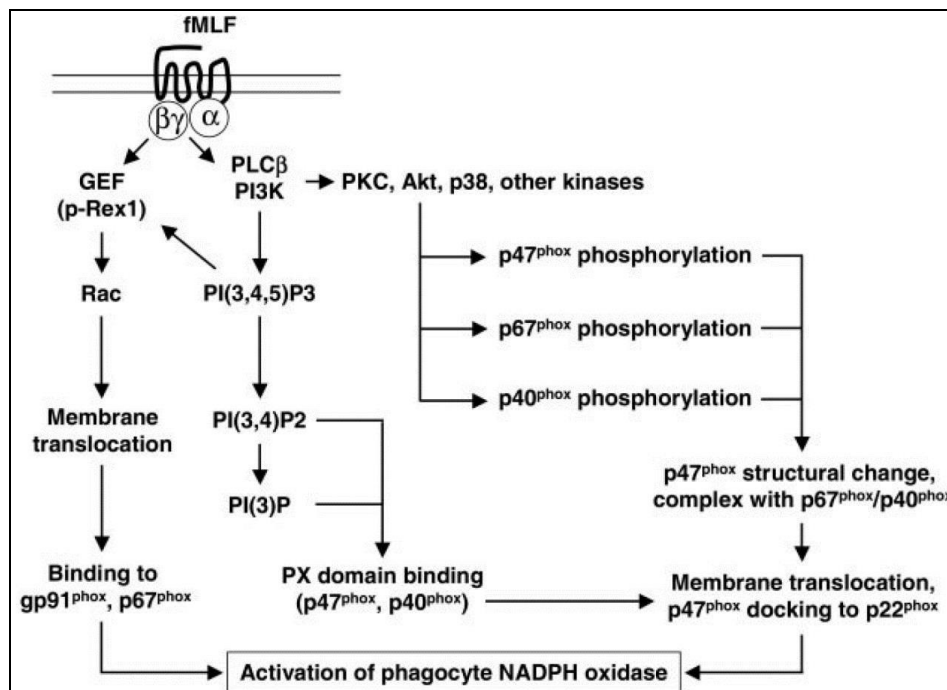


Figure 8. Evènements majeurs de signalisation induits par le fMLF conduisant à l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire (Ye *et al.*, 2009).

4. Activité anti-inflammatoire des plantes médicinales

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'effet anti-inflammatoire et anti-oxydant d'un grand nombre de plantes utilisées en médecine traditionnelle ainsi que le mécanisme d'action de plusieurs d'entre elles. Les substances actives des plantes peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant par exemple l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro inflammatoires, l'expression des

molécules d'adhésion et la production des FRO (Dowiejua et Zeitlin, 1993). *Curcuma longa* contient un polyphénol qui inhibe la production de la prostaglandine E2 et l'expression de la cyclooxygénase 2 (Madden *et al.*, 2009). Ce polyphénol inhibe aussi l'expression des gènes de L'IL-6 et de L'IL-8 et diminue de manière dose dépendante la production de NO et l'expression de l'enzyme NO Synthéase (NOS) inductible (Mathy *et al.*, 2007). Certains constituants de *Zingiber officinale*, largement utilisé en médecine asiatique et arabe pour traiter les inflammations et les rhumatismes, inhibent la production du TNF- α en agissant sur l'expression des gènes (Setty et Sigal, 2005). *Harpagophytum procumbens*, plante issue de la médecine traditionnelle africaine, réduit significativement l'œdème de la patte induit par le Carrageenan (Catelan *et al.*, 2006). L'activité anti-inflammatoire de *Harpagophytum procumbens* est peut être due à sa capacité d'inhiber la synthèse des eicosanoïdes et la production du TNF- α par les monocytes humains ou à son pouvoir de réduire la production de la myelopéroxydase par les neutrophiles (Setty et Sigal, 2005). *Urtica dioica* est une plante largement utilisée dans la région méditerranéenne pour le soulagement de la rhinite allergique, l'eczéma et les douleurs arthritiques (Lin *et al.*, 1995).

En Algérie, la phytothérapie est utilisée depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle. Les plantes jouent un rôle très important dans les traditions thérapeutiques et la vie des habitants, mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne. Ces dernières années, beaucoup de recherches se sont orientées vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes. Mais peu d'études ont été effectuées sur les plantes endémiques au Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde, possédant dans sa partie nord, le Sahara septentrional, une végétation diffuse et clairsemée (Ozenda, 1991). L'état de la flore spontanée dans cette zone ainsi que les relations entre l'homme et les espèces végétales, méritent une attention particulière. *Zygophyllum gaetulum* et *Anvillea garcinii*, deux herbes sahariennes endémiques utilisées par la population algérienne contre plusieurs maladies, sont très peu étudiées et mériteraient qu'on leur accorde plus d'intérêt.

Zygophyllum gaetulum est largement utilisée en médecine traditionnelle pour des indications thérapeutiques très variées, comme les affections gastro-intestinales, hépatiques, antidiabétiques (Bellakhdar, 1997) et principalement comme anti-inflammatoire (Ait El Cadi *et al.*, 2012). En outre, elle est employée pour les soins corporels des nourrissons et comme cicatrisant externe (Baba Aissa, 1991).

Certaines activités de l'extrait de *Zygophyllum gaetulum* ont été confirmées scientifiquement telles que l'activité antidiabétique (Jouhari *et al.*, 1998; Jouhari *et al.*, 1999; Jouhari *et al.*, 2000), anti diarrhéique et antispasmodique (Ait El Cadi *et al.*, 2008), anti-inflammatoire [Rimbau *et al.*, 1999, Khabbal *et al.*, 2006) et antipyrétique (Larhsini *et al.*, 2002). L'extrait aqueux de cette plante peut être utilisé comme analgésique et anti-dépresseur (El Hamsas El Youbi *et al.*, 2010). Les extraits aqueux, éthanolique (Rimbau *et al.*, 1999; Ait El Cadi *et al.*, 2012) et chloroformique (Rimbau *et al.*, 1999) de *Zygophyllum gaetulum* réduisent significativement l'œdème induit par la carragenine, un modèle d'inflammation aigüe chez les rats albinos. Rimbau *et al.*, (1999) ont confirmé l'effet anti-inflammatoire de *Zygophyllum gaetulum* en utilisant un deuxième modèle d'inflammation aigüe, l'œdème d'oreille induit par l'acide arachidonique chez les souris.

Selon la tradition locale, *Anvillea garcinii* est utilisée comme anti-inflammatoire ; l'infusion (ou la macération) des feuilles et des tiges étant, quant à elle, utilisée dans le traitement des pathologies broncho-pulmonaires (Maiza *et al.*, 1993) et digestives (indigestion) (Bellakhdar, 1997; Chema, 2006). De leur côté, les pousses d' *Anvillea garcinii*, en fusion à froid ou à chaud, sont utilisées comme remède contre le diabète (Maiza *et al.*, 1993; chema, 2006).

Très peu d'études ont été effectuées sur *Anvillea garcinii*. Certains de ses composants ont montré un effet antitumoral (Abdel Sattar *et al.*, 1996; El Hassany *et al.*, 2004) et une puissante activité antimicrobienne (El Hassany *et al.*, 2004). Une activité antifongique des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* a été confirmée expérimentalement par Mebarki *et al.* en 2013. En effet, les vertus thérapeutiques des plantes sont dus à la présence de certains composants bio-actifs ayant plusieurs propriétés thérapeutiques telles que des propriétés anti-inflammatoires, antihistaminiques, antitumorales, hypocholestérolémiantes, antidiabétiques, analgésiques et immunomodulatrices (Wasser et Weis, 1999; Scartezzini et Speroni, 2000). Parmi ces principes bio-actifs, les polysaccharides ont reçu, en raison de leurs propriétés immunomodulatrices, une attention particulière de la part des chercheurs œuvrant dans le domaine biomédical. Plusieurs polysaccharides d'origine végétale ont en effet la particularité de stimuler les défenses de l'hôte en favorisant la maturation, la différenciation et la prolifération des cellules immunitaires, ce qui leur confère plusieurs propriétés thérapeutiques notamment des propriétés anticancérigènes, antibactériennes et antivirales (Ooi et Liu, 1999; Wasser, 2002).

5. Les polysaccharides d'origine végétale

5.1. Définition

Les glucides sont constitués selon la formule empirique $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Ils incluent les monosaccharides, les disaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides. Ces composés sont les principales substances nutritives de la plupart des organismes, notamment sous la forme de sucre simple (glucose) (Jiao *et al.*, 2016). Ils fournissent l'énergie et les carbones nécessaires pour la biosynthèse de protéines, d'acides nucléiques, des lipides et d'autres glucides. La plupart des polysaccharides se trouvent associés à la membrane et à la paroi cellulaire (Griffin, 1994). Les polysaccharides végétaux sont souvent appelés biomacromolécules complexes, ce sont des polymères de molécules de carbohydrate construites avec plus de dix, des centaines ou des milliers de monosaccharides reliés par des liaisons glycosidiques (Jiao *et al.*, 2016). Ils varient en fonction de leurs sources et de leurs unités structurelles.

Les polysaccharides constitués de même type d'oses sont nommés les glycanes. Les polysaccharides végétaux naturels comprennent principalement la cellulose, l'hémicellulose, l'amidon, la pectine, la gomme, le fructosan, le mannosane, le xylane, etc (Jiao *et al.*, 2016). Leur diversité structurale concerne l'isomérisation, l'ordre et le nombre de monosaccharides reliés dans la macromolécule, l'anomérisation en carbone 1 (α ou β) de chaque monosaccharide, la configuration absolue des monosaccharides (D ou L), le type de liaisons glycosidiques à des chaînes ramifiées ou non ramifiées, ainsi que les groupes fonctionnels adaptés aux différents rôles biologiques (Courtois, 2009). Les unités monosaccharidiques dans les polysaccharides peuvent s'interconnecter de nombreuses façons pour former une grande variété de structures compliquées. En tant que classe de macromolécules, les polysaccharides ont différents niveaux d'organisations spatiales, y compris les structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires (Posocco *et al.*, 2015; Jiao *et al.*, 2016). Leurs structures primaires, Homo- ou hétéro-, ramifiées ou linéaires, avec un ou plusieurs types de liaisons, peuvent déterminer des niveaux plus élevés d'organisation spatiale, et peuvent également affecter les diverses propriétés des polysaccharides, comme leur solubilité dans l'eau, la cristallisation, l'agrégation, la viscosité du gel et les fonctions biologiques dans les cellules végétales (Gorshkova *et al.*, 2013). Gorshkova *et al.* (2013) ont résumé les 10 types de squelettes polysaccharidiques qui existent dans les parois des cellules végétales. Parmi eux, les liaisons β - (1→4) sont les plus extensives, comme: β -D-(1→4) -Xylp, β -D- (1→4) -Glc, β -D- (1→4)

-Galp et β -D- (1 \rightarrow 4) -Manp. Les chaînes neutres peuvent également contenir β -D- (1 \rightarrow 3) -Glc, β -D- (1 \rightarrow 3) -Galp et β -D- (1 \rightarrow 6)-Galp et α -L- (1 \rightarrow 5)-Araf (Dong *et al.*, 2014).

5.2. Propriétés thérapeutiques des polysaccharides

Les polysaccharides sont des macromolécules biologiques largement répandues dans la nature. Ils sont appelés immunomodulateurs, immunostimulateurs ou modificateurs de la réponse biologique (Gao *et al.*, 1996; Kidd, 2000). Ce sont l'une des principales classes de substances bioactives de champignons, des algues et des plantes supérieures (Joseph *et al.*, 2013). La plupart des polysaccharides d'origine végétale sont relativement non toxiques, ne provoquent pas d'effets secondaires graves et présentent une large gamme d'activités pharmacologiques (Finlay et Hancock, 2004). Ces molécules bioactives sont reconnues pour leurs effets thérapeutiques, supposés se produire par l'intermédiaire de la stimulation des macrophages et de la modulation du système du complément (Schepetkin et Quinn, 2006). Ils sont principalement reconnus pour leurs propriétés immunomodulatrices (Schepetkin et Quinn, 2006; Xie *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013), anticancérigènes (Liu *et al.*, 2007), antivirales (Talarico *et al.*, 2005), antibactériennes, antioxydantes (Ye *et al.*, 2011), anticoagulantes (Athukorala *et al.*, 2006), anti-compléments (Xu *et al.*, 2007), anti-ulcéreuses (Ye *et al.*, 2003), hypoglycémiantes (Tong *et al.*, 2008) et antiinflammatoires (Wu *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2010).

Des études effectués sur des polysaccharides extraits de différentes plantes médicinales ont confirmé leurs effets bénéfiques sur une variété de maladies, comme la lésion hépatique aiguë (Xiao *et al.*, 2012), les lésions hépatiques chez les personnes acholiques (Xiao *et al.*, 2014a), stéatose hépatique non alcoolique (Xiao *et al.*, 2013, Xiao *et al.*, 2014b), incapacité sexuelle (Lau *et al.*, 2012), accident vasculaire cérébral (Yang *et al.*, 2012) et la maladie d'Alzheimer (Ho *et al.*, 2009). Ils ont la capacité d'améliorer une large gamme de blessures et de maladies de sécrétion endocrine, ainsi que les systèmes reproducteurs et immunitaires (Attele *et al.*, 1999).

Des polysaccharides extrait à partir de *Phellinus ribis*, présentent une activité neurotrophique, qui a favorisé de façon significative la croissance des cellules nerveuses immatures, ce qui suggère qu'il pourrait être un candidat potentiel pour le traitement des maladies neurodégénératives (Liu *et al.*, 2015). Deux dérivés sulfatés de β -Glucanes de *P. ribis* présentent des propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales marquées (Liu *et al.*, 2015). Une fraction polysaccharidique de type pectique extraite des bulbes d'oignon, diminue

l'absorption de l'ovalbumine dans le sang à partir de la lumière intestinale (Golovchenko *et al.*, 2012). Des polysaccharidiques extraits à partir des racines de *Vernonia kotschyana*, plante médicinale de la famille des Asteraceae, ont une activité antiulcéreuse gastrique et participe dans l'amélioration de la santé générale (Austarheim *et al.*, 2012). Les polysaccharides extraits à partir des feuilles de *Ziziphus mauritiana* (Rhamnaceae) ont une activité antidiabétique (Diallo *et al.*, 2004). Les polysaccharides extraits des écorces de *Geoffroea spinosa* (Fabaceae) ont une activité anticoagulante, antiplaquettaire et des effets anti-thrombotiques (Souza *et al.*, 2015).

La compréhension du mécanisme d'action de ces substances est encore en cours de développement. Généralement les polysaccharides ne peuvent pénétrer dans les cellules en raison de leur grande taille moléculaire, ils exercent leur action en se liant à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules immunes telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules cytotoxiques naturelles (NK) et les lymphocytes T. Parmi ces récepteurs, le CR3, un des plus importants récepteurs membranaires chez les phagocytes impliqués dans la reconnaissance des pathogènes, a été identifié comme un des récepteurs des P-glucanes, au même titre que le CRI (Oka *et al.*, 1996; Vetvicka *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2001). L'affinité différentielle montrée par les récepteurs vis-à-vis des différents P-glucanes varie en fonction du poids moléculaire, de la conformation acquise en solution, ainsi que du degré de ramification de ces molécules. Cette affinité différentielle affecte de manière significative leur activité immunomodulatrice (Falch *et al.*, 1999; 2000; Ooi et Liu, 1999; Mueller *et al.*, 2000).

5.3. Activités antioxydante et anti-inflammatoire des polysaccharides d'origine végétale

Le traitement actuel des troubles inflammatoires dans la médecine occidentale, implique l'utilisation extensive des médicaments non stéroïdiens, anti-inflammatoires, et les corticostéroïdes, qui ont des effets secondaires aux doses élevées et en cas d'utilisation prolongée. Ces deux groupes de drogues pharmaceutiques ne sont pas idéaux pour le traitement de l'inflammation (Wang *et al.*, 2013). De nos jours, une plus grande attention est concentrée sur la recherche de composants bioactifs à partir de plantes médicinales à activité anti-inflammatoire. Des études effectuées *in vitro* et *in vivo* ont révélé des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de plusieurs types de polysaccharides d'origine végétale. Le mécanisme de base d'action de ces macromolécules, est supposé se produire par l'intermédiaire de la stimulation des macrophages et de la modulation du système du

complément. La modulation de l'immunité innée a un impact important sur la capacité de l'hôte à répondre rapidement et puissamment à un large éventail d'agents pathogènes (Schepetkin et Quinn, 2006).

La perfusion intraveineuse de fucoïdane, un polysaccharide sulfaté d'algues brunes, inhibe la méningite expérimentale chez les lapins par la réduction de roulement des leucocytes (Granert *et al.*, 1994). Ces effets anti-inflammatoires ont été attribués à la liaison des polysaccharides à L- ou P-selectines, qui sont des molécules d'adhésion cellulaire essentielles pour le processus de recrutement des leucocytes. Paulsen (2001) a montré que de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle pour la cicatrisation des plaies partout dans le monde semblent avoir une chose en commun, elles sont riches en polysaccharides qui peuvent être responsables des propriétés de cicatrisation des plaies. Des polysaccharides naturels diminuent significativement l'expression des cytokines pro-inflammatoire, comme IL-1 β , IL-6 et INF- γ , tandis qu'ils augmentent la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires, comme IL-10 et MIP-1 β (Macrophage inflammatory protein-1 β) (Ostergaard *et al.*, 2000; Schepetkin et Quinn, 2006; Liu et Lin, 2012).

L'activité anti-complément des polysaccharides constitue une stratégie thérapeutique potentielle pour le traitement de maladies inflammatoires (Wagner *et al.*, 1990; Samuelsen *et al.*, 1995; Nergard *et al.*, 2004; Inngjerdingen *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2007). Austarheim *et al.* (2012), confirment que l'écorce et les feuilles de *Cola cordifolia* (*Malvaceae*) contiennent des polysaccharides à forte activité de fixation du complément. De même, cette activité est observée avec les polysaccharides extraits à partir des tiges et des feuilles de *Terminalia macroptera* (Zou *et al.*, 2015). En 2007, Xie *et al.* ont montré que les polysaccharides extraits de *Tanacetum vulgare* stimulent les fonctions des neutrophiles par une forte augmentation de la libération de la MPO. En outre, des polysaccharides extraits *Artemisia tripartite* ont une activité stimulatrice des fonctions des macrophages, ils améliorent la production des FRO intracellulaire et la libération d'oxyde nitrique. Ces extraits ont, par ailleurs, montré une forte activité scavenger des FRO générés par voie enzymatique ou produite par les neutrophiles humains (Xie *et al.*, 2008). Tong *et al.* (2013) ont montré que les polysaccharides extraits de *Bupleurum chinense* affectent de manière significative le recrutement et la migration des neutrophiles en bloquant les récepteurs de chimioattractants, ces extraits inhibent l'activation induite par le fMLF de chimiotactisme et le regroupement des intégrines β 2, la polymérisation de l'actine, et l'activation de Vav1 et Rac1. Xiao *et al.* (2014) ont démontré que les polysaccharides extraits de *Lycium barbarum* réduisaient fortement la production directe de

FRO dans les cellules hépatiques et restauraient les taux d'expression endogènes des enzymes antioxydantes dans des circonstances pathologiques.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. MATERIEL

1.1.1. Milieux et réactifs

Tous les produits chimiques utilisés au cours de nos expérimentations sont de grade analytique. Le PMA (Phorbol Myristate Acetate), le fMLP (formyl-méthionyl-leucylphenylalanine), le sucrose, le Tween 20, Le luminol, le cytochrome C, le HRP (horse radish peroxidase), les inhibiteurs de protéases et de phosphatases, les tampons stérils HBSS (Hanks Balance Salt Solution) et PBS (Phosphate Buffered Saline), l'ATP, ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le Dextran T500 provient de Pharmacosmos (Holbaek, Denmark) et le Ficoll de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden). Le RPMI et l'HEPES sont fournis par Gibco (Grande island). Diisopropylfluorophosphate (DFP) est fourni par Calbiochem-Merck (Nottingham, UK). Les réactifs utilisés pour les SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) et les Western Blots sont produits par Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Les kits ECL utilisés sont commercialisés par Santa Cruz. Les anticorps anti-protein kinase C sont fournis par GeneTex. Les anticorps monoclonaux anti-CD11b humain conjugués à la phycoérythrine (PE) sont de Beckman Coulter (Marseille, France), les anticorps anti-MPO sont fournis par Abcam (Cambridge, UK), les anticorps anti-p22^{PHOX}, anti-ERK1/2, anti-PKC, anti-IgG de lapin et de souris conjugués à la peroxydase et anti-IgG de lapin et de souris conjugués à la phosphatase alcaline ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany). Les anticorps anti-p38 MAPK, anti-phospho-p38 MAPK, et Les anticorps anti-Erk1/2 proviennent de R&D systems Europe (Lille, France). Les anticorps anti-ERK1/2, p22, anticorps monoclonaux de souris anti- β -actine ainsi que les anticorps de lapin ou de chèvre couplés au HRP (peroxidase). Les kits ECL utilisés sont commercialisés par Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Les anticorps anti-p47phox et anti-p67phox ont été offerts par le Pr Bernard Babior (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Les anticorps de lapin dirigés contre les phospho-sérines de la p47^{phox} (phospho-Ser328) ont été généreusement offert par Dr. El-Benna Jamel (INSERM U1149, ERL 8252 CNRS, Centre de Recherche sur l'Inflammation, Paris, France).

1.1.2. Animaux

Des souris Swiss albinos (Institut Pasteur Alger), pesant entre 20 et 30g ont été utilisées pour l'étude *in vivo* après une période d'adaptation de 7 jours. Elles ont été hébergées dans des cages de polypropylène a une température ambiante, avec accès libre a l'eau et a l'alimentation.

1.1.3. Matériel végétal

Les deux plantes médicinales, *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum*, utilisées dans cette étude, ont été récoltées au mois d'avril 2010 dans la région de Biskra et Ghardaya (nord est du Sahara algérien). L'identification a été faite par un spécialiste. La partie aérienne de chaque plante a été nettoyée avec de l'eau distillée et de l'éthanol, séchées à l'ombre et à température ambiante, puis stockées à l'abri de la lumière. La poudre est préparée juste avant l'extraction.

1.2. METHODES

1.2.1. Extraction des polysaccharides solubles à l'eau chaude

Les polysaccharides ont été préparés selon la méthode de Bendjeddou *et al.* (2003). 170 g de la poudre de *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum* ont été dissout séparément dans de l'eau distillée à un taux de 1 g de poudre pour 20 ml d'eau. La suspension de chaque échantillon a été agité dans un bain marie à 100°C pendant 3 heures avant d'être refroidi et conservé pendant une nuit au réfrigérateur. La suspension a été remuée dans un bain marie à 95°C pendant 3 heures. Après refroidissement et incubation pendant une nuit dans le réfrigérateur, l'infusion est centrifugée à 6000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant est ensuite évaporé jusqu'à la moitié sous un bain marie à 95°C. La quantité obtenue est filtrée afin d'éliminer les résidus. Les polysaccharides sont précipités en ajoutant quatre volumes d'éthanol (95 %) au filtrat. Un culot de 18.9 g (11.11 %) pour *Zygophyllum gaetulum*, et de 16.48 g (9.69 %) pour *Anvillea garcinii* a été collecté par centrifugation pendant 30 minutes à 10000 rpm, chaque culot a été lavé avec de l'éthanol et séché et par la suite dissous dans de l'eau distillée (1 g/50 ml), après traitement au TCA (Tri-Chloro-acetic Acid) et au C₂H₃NaO₂ (acétate de sodium) pour éliminer les protéines (Wagner *et al.*, 1988 in Bendjeddou *et al.*, 2003), les polysaccharides sont précipités par l'addition de quatre volumes d'éthanol. Le culot est collecté et séché pour être étudiés ultérieurement.

1.2.2. Effet des extraits de *Zygophyllum gaetulum* et *Anvillea garcinii* sur l'œdème de l'oreille de souris induit par l'xylène.

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vivo* des polysaccharides extraits de *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum*, nous avons utilisé le mode d'œdème d'oreille induites chez les souris saines par l'xylène selon la méthode décrites par Hosseinzadeh *et al.* (2002), Rotelli *et al.* (2003) et Delaporte *et al.* (2004). Quatre groupes de souris sont utilisés dans ce test. Les souris du groupe témoin reçoivent par une injection intrapéritonéale (IP) d'une solution de NaCl 0.9 % (véhicule). Alors que les souris des groupes traités reçoivent 50, 150 ou 300 mg/kg de l'extrait de Zyg ou d'Anv. 24 heures plus tard, nous avons induit l'œdème de l'oreille par l'application topique de 30 µl de xylene sur la surface antérieure et postérieure de l'oreille droite de chaque souris des quatre groupes à l'aide d'une micropipette. L'épaisseur de l'oreille est mesurée avant et une demi-heure après l'induction de l'inflammation par un pied a coulisse digital (Delaporte *et al.*, 2004). Cette expérience a été répétée trois fois avec différents lots d'animaux.

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème et déterminé par rapport au résultat du groupe témoin (témoin) considéré comme le 100% d'œdème en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Ec} - \text{Ee} / \text{Ec}) \times 100$$

Ec : Moyenne de l'épaisseur de l'œdème du groupe témoin. **Ee :** Moyenne de l'épaisseur du groupe de souris traité (tests).

1.2.3. Isolement des neutrophiles et des monocytes humains

Les neutrophiles et les monocytes ont été isolés dans des conditions stériles selon la méthode décrite par El Benna *et al.* (1994) à partir du sang frais de donneurs sains, fourni par l'Etablissement Français du Sang (Hôpital Necker-Cabanel, Paris 15ème et Hôpital Bichat-Claude Bernard- Paris 18ème). Afin de sédimenter les globules rouges, un volume de sang collecté avec du citrate est mélangé à un volume de Dextran T500 à 2% préparé dans du NaCl 0,9% stérile. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le surnageant est récupéré pour être centrifugé à 400g pendant 10 minutes à 20°C. Les culots récupérés sont suspendus dans du PBS, puis délicatement déposés sur du Ficoll à raison de 2 volumes de cellules par un volume de Ficoll. Après centrifugation en gradient de densité pendant 30 minutes à 400g et à 20°C, l'anneau des cellules mononucléées (monocytes/lymphocytes) ou PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) formé à l'interface PBS-Ficoll est récupérée

délicatement pour l'isolement des monocytes, le culot qui contient les neutrophiles et les hématies contaminants est soumis à une hémolyse de 30 sec réalisée par addition d'un volume d'eau distillée, l'isotonicité est ensuite rétablie par addition d'un même volume de NaCl 1,8%. Après une centrifugation de 10 minutes à 400g et à 4°C, le culot des neutrophiles est resuspendus dans du PBS froid, et les cellules sont comptées en utilisant un hémocytomètre Malassez. Les monocytes ont été purifiés en utilisant la technique des billes magnétique marquées avec un anti-CD14 fournis par Miltenyi (Paris, France) (Chedid *et al.*, 2012). La pureté cellulaire a été déterminée par une analyse en cryométrie et la viabilité a été étudiée par la coloration au bleu de Trypan.

1.2.4. Mesure de la production des FRO du sang total, des monocytes et des neutrophiles isolés du sang humain.

La production des FRO est mesurée par chimioluminescence amplifiée par le luminol. La chimioluminescence est une technique sensible qui permet de mesurer l'activité NADPH oxydase des cellules entières. Elle repose sur le principe de dissipation de l'énergie par émission de lumière par un composé lorsqu'il retourne d'un état excité à son état basal. La luminescence émise dans cet essai est le résultat d'une réaction d'oxydoréduction du luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phtahlazinedione) par les FRO produits par les cellules étudiées. Cette luminescence quantifiée par le luminomètre est proportionnelle à l'activité de la NADPH oxydase des cellules.

Pour mesurer les FRO du sang humain, nous le diluons (1/400) avec du HBSS à un volume final de 500 µl contenant 10 µM de luminol et 0,5 U de HRP (Horse Radish Peroxidase). Les neutrophiles (5×10^5) ou les monocytes (2×10^5) sont resuspendus dans du HBSS contenant 10 µM de luminol. Les cellules sont incubées en présence (témoin) ou en absence de 300 µg/ml de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygothallum gaetulum* à 37°C dans la chambre thermostatée du luminomètre (Biolumat LB937; Berthold) pendant 15 minutes. Cette lecture de base de luminescence correspond à l'activation spontanée de la NADPH oxydase des cellules. Ensuite, les cellules ont été stimulées avec du fMLF 10^{-7} M pour le sang total ou 10^{-6} M pour les phagocytes. L'émission de luminescence est ensuite enregistrée pendant 30 min et exprimée en pourcentage par rapport aux valeurs témoins.

1.2.5. Mesure de la production des FRO par les neutrophiles humains stimulés ou non par le fMLF ou le PMA

Nous avons étudié l'effet de différentes concentrations de *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum* sur la production de FRO de neutrophiles induite par le fMLF ou PMA. Les neutrophiles isolés (5×10^5) sont resuspendus dans du HBSS contenant $10 \mu\text{M}$ de luminol. Les cellules sont incubées en présence (témoin) ou en absence de différentes concentrations (19, 38, 76, 153, $300 \mu\text{g/ml}$) de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* à 37°C dans la chambre thermostatée du luminomètre (Biolumat LB937; Berthold) après 15 minutes, les cellules ont été ou pas stimulées avec du fMLF 10^{-6} M ou avec du PMA (100 ng/ml). L'émission de luminescence est ensuite enregistrée pendant 30 min et exprimée en pourcentage par rapport aux valeurs témoins.

1.2.6. Etude de la viabilité des neutrophiles en présence des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum*

Afin de vérifier que les effets des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur les neutrophiles ne sont pas dus à un effet cytotoxique, La viabilité de celle-ci est déterminée par le Kit Guava ViaCount Reagent (IFAS-Cytometry Bioscience, Millipore) suivant les instructions du fabricant. Les cellules sont suspendues dans un tampon HBSS à une densité finale de 24×10^4 PMNs / $60 \mu\text{l}$ et incubées 30 minutes à 37°C en présence ou en absence de différentes concentrations des polysaccharides. Les cellules sont ensuite incubées 5 min à température ambiante en présence de Guava ViaCount Reagent ($60 \mu\text{l}$), ce dernier contient deux colorants fluorescents: l'un permet la distinguer entre les cellules mortes et les cellules vivantes et l'autre distingue les cellules nucléés des débris cellulaires. Après avoir ajouter à chaque échantillon du tampon HBSS afin d'obtenir un volume finale de $600 \mu\text{l}$, l'intensité de fluorescence de chaque colorant est détecté par un cymomètre en flux (guava Flow Cytometry easyCyte Systems, IFAS-Cytometry Bioscience, Millipore). Cela nous a permis d'évaluer les cellules viables et non viables présentes dans la suspension cellulaires.

1.2.7. Mesure de la production d'anion superoxyde

La production de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) par les neutrophiles est mesurée à l'aide de la méthode de réduction du cytochrome c (Markert *et al.*, 1984). Cette technique est utilisée pour mesurer uniquement les FRO libérés dans le milieu extracellulaire.

Les neutrophiles isolés (5×10^5) sont resuspendus dans 500 μ l du tampon Hanks (HBSS) contenant 1 mg/ml de cytochrome *C* en présence (témoin) ou en absence de différentes concentrations de polysaccharides. Les échantillons ont été incubés dans la chambre d'un spectrophotomètre à double faisceau Uvikon 860 thermostaté à 37°C. Après 15 minutes, les cellules sont stimulées par le fMLF (10^{-6} M) ou par le PMA (100 ng/ml) et le changement d'absorbance a été mesuré à 550 nm pendant 10 min.

1.2.8. Evaluation de l'activité scavenger de H₂O₂

L'évaluation de l'effet scavenger de H₂O₂ est réalisée selon la méthode décrite par Ruch *et al.* (1983). Pratiquement, l'H₂O₂ (0.8mM) dans un volume final de 500 μ l du tampon HBSS est incubé en présence ou en absence (témoin) de différentes concentrations de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* à température ambiante pendant 10 minutes. La réaction est initiée par l'ajout de l'HRP (0.16 U) et la quantité de H₂O₂ a été mesurée pendant 20 min dans un luminomètre (Biolumat LB937; Berthold).

1.2.9. Evaluation de l'activité scavenger de l'anion superoxyde

L'effet scavenger de l'anion superoxyde par les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* est déterminé dans le système acellulaire xanthine/xanthine oxydase en suivant la réduction du cytochrome *C* à 550 nm (McCord et Fridovich, 1969). Le mélange réactionnel, préparé dans du HBSS, contient 0,02 U de xanthine oxydase et 100 μ M de cytochrome *C* est incubé à 30°C pendant 15 minutes en absence (témoin) ou en présence de différentes concentrations des extraits. La production du O₂•⁻ est initiée par l'ajout de 500 μ M de xanthine et on mesure l'absorbance à 550 nm pendant 10 minutes à 37°C dans un spectrophotomètre (UVIKON®860, KONTRON Instruments). La quantité du O₂•⁻ produit est exprimée en pourcentage par rapport au témoin non traité.

1.2.10. Translocation de PKC β et p47phox vers la membrane plasmique des neutrophiles en réponse au PMA

Les neutrophiles isolées (50×10^6 PMNs/ml) sont soumises à un traitement anti-protéasique par addition de 2.7 mM de DFP (Diisopropyl Fluorophosphate, Merk). Après 20 min d'incubation dans la glace, le traitement est arrêté en ajoutant un excès de PBS glacé (4 volumes) suivi d'une centrifugation à 400 g pendant 8 min à 4°C. Les neutrophiles sont

ensuite resuspendus dans du tampon A: tampon HBSS supplémenté par 0.05 % de BSA-Fraction V, 1 ml d'Hepes et 1 mM de NaN₃. Après 15 minutes d'incubation en absence (témoin) ou en présence de différentes concentrations de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum*, les cellules sont stimulées par le PMA (200 ng/ml) pour 8 minutes. La réaction est arrêtée en ajoutant 4 volumes de PBS glacé suivi d'une centrifugation à 400 g pendant 8 min à 4°C. Les culots cellulaires sont ensuite resuspendus (50 x 10⁶ cellules/ml) dans du tampon B (tampon de relaxation) glacé (RB : relaxation buffer : Pipes pH 7,3 10 mM, NaCl 3 mM, MgCl₂·6H₂O 3,5 mM, KCl 100 mM) additionné de 1mM EGTA, 1 mM d'ATP, 52 nM de calyculine A, 5 µg/mL d'aprotinine, leupeptine et pepstatine, inhibiteurs des protéases, et 0,5mM PMSF, inhibiteur de serine protéases, 1 mg/ml de NaF et 0,5 mg/mL de β-Glycerophosphate) (Dang, P. M. *et al.* 1999). Les cellules sont ensuite soumises à 3 cycles de sonication de 10 sec dans un bain de glace à 50W. La suspension est ensuite centrifugée à 400g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants comportant les cellules cassées sont récupérés et déposés sur un gradient discontinu de deux couches de sucrose 15%-35% puis soumis à une ultracentrifugation à 100 000 g pendant 50 min à 4°C. A la fin de l'ultracentrifugation, la fraction cytosolique est récupérée au dessus de la couche de sucrose de 15% puis dénaturée dans le tampon Laemmli. La fraction membranaire forme un anneau entre les deux couches de sucrose alors que la fraction particulaire (granulaire) forme un culot au fond du tube. Le culot de la fraction particulaire est prudemment rincé avec du tampon B (RB) puis resuspendu dans du sucrose 15% pour être dénaturée dans le tampon Laemmli. La fraction membranaire récupérée est lavée par addition d'un volume du tampon B (RB) puis soumise à une deuxième ultracentrifugation dans les mêmes conditions. Les membranes sont alors récupérées dans le culot qui est resuspendu dans du sucrose 15% puis dénaturé dans le tampon Laemmli. Les échantillons dénaturés sont ensuite stockés à -80°C pour être analysés ultérieurement en SDS-PAGE et western Blot.

1.2.11.Effet de Anv et Zyg sur la phosphorylation de la Ser328 de la p47phox, de ERK (1/2) et de p38 MAPKinase des neutrophiles en réponse au PMA

5 x 10⁶ de neutrophiles isolés sont suspendus dans 500 µl du tampon HBSS et incubés pendant 15 minutes à 37 ° C en absence (témoin) ou en présence de différentes concentrations de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* avant d'être stimulés pendant 8 minutes par PMA (100 ng/ml).

La réaction est arrêtée par ajout de 125 µl de tampon Laemmli 5 fois concentré et les échantillons sont dénaturés à 100 °C pendant 3 minutes, soniqué (2 x 10 sec) avant d'être conservé à -80°C jusqu'à analyse par Western blot.

1.2.12. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la dégranulation des neutrophiles

a) Analyse de la myéloperoxydase par Western blot

L'analyse par Western blot de la myéloperoxydase a été effectuée pour évaluer la dégranulation des neutrophiles. Les neutrophiles (5×10^6 /ml dans 500 µl de HBSS) sont incubés en présence ou en absence (témoin) de différentes concentrations de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* à 37°C pour 15 minutes. Les cellules ont été stimulées par le fMLF 10^{-6} M pendant 5 min ou par 100 ng/ml PMA pendant 15 min à 37°C. La dégranulation a été arrêtée par le refroidissement des aliquotes de cellules dans du méthanol glacé (-80° C) pendant 5 secondes. Après une centrifugation (4°C) de 8 minutes à 2000 rpm (Centrifugeuse Eppendorf 5415D, Hamburg, Germany), le surnageant contenant la MPO libérée dans le milieu extracellulaire est récupéré, puis dénaturée par ajout de tampon Laemmli 5 fois concentré (Laemmli, 1970) contenant 5 mmol/l Na_3VO_4 , 2.5 mmol/l p-nitrophenyl phosphate, 10 mmol/l NaF, 5 mmol/l EDTA, 5 mmol/l EGTA, 20 mg/l leupeptin, 20 mg/l pepstatin, et 20 mg/l aprotinin. Les échantillons sont chauffés à 100 °C pendant 3 minutes et ensuite soniqué et conservés à -80°C jusqu'à analyse par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques anti-MPO (1 :5000).

b) Analyse de l'expression membranaire des neutrophiles du CD11b par cytométrie en flux

Les neutrophiles isolés (2.5×10^6 /ml dans du HBSS) sont incubés à 37°C pendant 15 minutes en présence ou en absence (témoin) de différentes concentrations de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* avant d'être stimulés par du fMLF (10^{-6} M) pendant 5 minutes, La stimulation est arrêtée en transférant les tubes dans la glace. 100 µl de chaque échantillon sont marqués par 10 µl d'anticorps monoclonaux anti-CD11b humaine conjugués à la phycoérythrine (PE) (BD Biosciences, San Jose, CA) pendant 15 minutes dans un bain de glace. Les échantillons ont été ensuite lavé deux fois par du PBS glacé, centrifugé à 1800 rpm et conservés sur la glace jusqu'à analyse par cytométrie en flux (FACS Canto II, BD Biosciences, Oxford, UK). Les interactions non spécifiques des

anticorps sont contrôlées en utilisant des anticorps du même isotype (témoin isotypique). L'intensité de fluorescence moyenne (MFI) des cellules CD11b positives est déterminée après l'identification de la population des neutrophiles et l'élimination des autres types cellulaires et les débris par Forward et side scatter. Tous les résultats sont obtenus avec une valeur constante du gain des PMT (photomultiplicateurs).

1.2.13. La mesure de calcium intracellulaire

Les variations des taux du calcium intracellulaire sont mesurées par Fura-2/AM (acétoxyméthylester), un indicateur fluorescent sélectif du calcium intracellulaire. Fura-2 est une sonde à double longueur d'onde d'excitation et une seule longueur d'onde d'émission. Le Fura-2 non complexé au calcium possède un pic d'excitation à 380 nm, alors que le Fura-2 complexé au calcium présente une excitation maximale à 340 nm. La sonde est alternativement excitée à 340 nm puis à 380 nm tout au long de l'expérience. La longueur d'onde d'émission est mesurée à 510 nm dans les deux cas. De ce fait, une augmentation de la fluorescence émise lors d'une excitation à 340 nm (F340) accompagnée d'une diminution de la fluorescence émise lors d'une excitation à 380 nm (F380) traduit une augmentation du calcium cytoplasmique. Les variations du rapport F340/F380 reflètent donc les variations en calcium intracellulaire (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Les neutrophiles (5×10^6 cellules/ml de HBSS), sont incubés avec 5 μ M de Fura-2/AM contenant 0,01% d'acide pluronique pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules chargées sont lavées dans du HBSS et incubées 15 minutes à 37 °C en présence et en absence (témoin) de 300 μ g/ml de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygothymum gaetulum*. Les changements des taux du Ca^{2+} intracellulaire induits par le fMLF (10^{-6} M) sont, et la fluorescence est mesurée dans un fluorimètre à double longueur d'onde excitation, à 340 et 380nm pour l'excitation et à 510nm pour l'émission.

1.2.14. SDS-PAGE et Western Blot

Les échantillons préparés précédemment ont été analysés par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Laemmli, U. K. 1970) suivi d'un western blot. Brièvement, les échantillons sont soniqués durant 10 sec pour les fluidifier en cassant l'ADN avant de les soumettre à une séparation sur un gel de 10% d'acrylamide. Le tampon de migration contenait 0.025M de Tris-Base, 0.192M de Glycine et 0.1% de SDS. Les protéines ainsi séparées sont transférées en milieu liquide (0.05M de Tris-

Base, 0.095 M de Glycine, 0.08 % de SDS et 20% de Méthanol) sur une membrane de nitrocellulose de 0.4 μ M de diamètre (Millipore) pendant 1h30 à 250 mA.

Après le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, les sites non spécifiques de celle-ci sont saturés pendant 1h dans du lait 5% préparé dans du TBS-tween20 (Tris-HCl 25mM pH7.5, NaCl 150mM, tween 20 0.05%). Les membranes sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante ou sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires appropriés, (Anti MPO (1:5000), anti-phospho-Ser328-p47^{phox} (1:2000), anti-p47^{phox} (1:5000), anti-phospho-p38 MAPK (1:1000), et anti-phospho-ERK1/2 (1:2000), anti-p38 MAPK (1:1000), anti-ERK1 (1:1000), anti-ERK2 (1:1000), anti-PKC β ou anti-PKC α (1:1000)). Après 3 lavages de 5 minutes par du TBS-Tween 0,1%, les membranes sont incubées, pendant 1 heure à température ambiante, avec les anticorps secondaires correspondants ; l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqués à la peroxydase (1 :30 000), anticorps de chèvre anti-IgG de souris marqués à la peroxydase (1:10 000), anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqués à la phosphatase alcaline (1:10 000), ou anticorps de chèvre anti-IgG de souris marqués à la phosphatase alcaline (1:10 000). Les bandes protéiques sont révélées en utilisant le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Santa Cruz, CA, USA) lorsque les anticorps marqués à la peroxydase sont utilisés, où une caméra (Fusion Fx7) est utilisée pour détecter le signal. Dans le cas où l'anticorps secondaire est conjugué à la phosphatase alcaline, la révélation est effectuée en ajoutant un substrat chromogène contenant 0,015% de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) et 0,3 mg/ml de NBT (nitroblue tetrazolium) dans 0.1 M de tampon carbonate contenant 1 mM de MgCl₂. Les bandes protéiques obtenues sont quantifiées en utilisant le logiciel Image J 1.43u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

1.2.15. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM d'au moins trois expériences indépendantes. L'analyse de variance par One-way ANOVA suivie par le test de Tukey pour les comparaisons multiples est effectuée en utilisant la version 4.0 de GraphPad Prism pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). La différence est considérée statistiquement significative au risque de 5% ($p < 0.05$).

2. RESULTATS

2.1. Description des deux plantes étudiées

Anvillea garcinii et *Zygophyllum gaetulum*, ont été récoltées au mois d'avril 2010 dans la région de Biskra et Ghardaya (nord du Sahara algérien). L'identification a été faite par un spécialiste. Nous présentons si dessous la description morphologique et la classification des deux plantes.

2.1.1. *Zygophyllum gaetulum*

c) Description morphologique

Zygophyllum gaetulum ou "Aggaya" est endémique au sud du Maroc et au Nord-Ouest du Sahara algérien. C'est une plante arbuste vivace de taille moyenne, 50 cm, ligneuse à la base (**Figure 9**). Elle pousse en petits buissons à ramifications intenses des branches et à rameaux blanchâtres. Les feuilles sont petites, composées de deux folioles et charnues, de même couleur que les rameaux. Les fleurs, portées sur un petit pédoncule velu, sont minuscules (5 mm), ovoïdes, avec 5 pétales blancs. Le fruit a une base tubulaire qui s'élargit vers le haut avec cinq lobes, il mesure environ 2 cm de longueur. Cette plante fleurit habituellement au printemps, mais certaines fleurs ont été observées à l'automne.

d) Classification

Règne : Plante

Class: Magnoliopsida

Famille: Zygophyllaceae

Genre: *Zygophyllum*

Espèce : *Zygophyllum gaetulum*



Figure 9. Aspects morphologiques de l'espèce *Zygophyllum gaetulum*.

2.1.2. Anvillea garcinii

a) Description de la morphologie

Anvillea garcinii ou nougd est une plante médicinale endémique au Sahara qui répartie sur le Nord et le centre du Sahara Algérien et principalement les montagnes du Tassili. Elle présente des caractères morphologiques divers : végétaux à port extrêmement varié constitués d'arbustes et parfois d'arbrisseaux. Généralement, ce sont des herbes annuelles ou bisannuelles, plus ou moins pérennes. Ils possèdent des lianes herbacées grimpantes ou rampantes (**Figure 10**). Les feuilles très polymorphes petites sont sans stipules, alternes ou opposées et en rosettes. Elles sont simples, entières ou dentelées et parfois divisées en plusieurs segments plus ou moins grands. En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques : le capitule. Les fleurs sont serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité élargie d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales appelée involucre. Le fruit est un akène généralement surmonté d'un pappus provenant du calice après la fécondation.

b) Classification

Règne: Plantae

Classe: Magnoliopsida

Famille: Asteraceae

Genre: Anvillea

Espèce: *Anvillea garcinii*



Figure 10. Aspects morphologiques de l'espèce *Anvillea garcinii*

2.2. Extraction des polysaccharides solubles à l'eau chaude

Après la récolte des deux plantes médicinales, *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum*, dans la région de Biskra et Ghardaya (nord du Sahara algérien). La partie aérienne de chaque plante a été nettoyée, séchée puis broyée. 170g de la poudre de chaque plante a subi une extraction à l'eau chaude et précipitation à l'éthanol pour obtenir 16.48 et 18.9g d'extrait brut avec un rendement de 9,69% 11,11% pour *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum* respectivement (**Figure 11**).

L'extrait brut a subi un traitement au tri-chloro-acetic acid et à l'Acétate de Sodium pour éliminer les protéines puis une dialyse contre l'eau distillée pour éliminer les petites molécules afin d'obtenir un extrait polysaccharidique de 3.18g et 2.48g pour *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum* respectivement (**Figure 11**).

2.3. Effet anti-inflammatoire des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum*

L'effet anti-inflammatoire des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* a été investigué par un modèle d'inflammation aiguë dans lequel un œdème à l'oreille de souris est induit rapidement avec le xylène (Hosseinzadeh *et al.*, 2002; Rotelli *et al.*, 2003; Delaporte *et al.*, 2004). Avant l'induction de l'œdème, les souris ont reçu ou pas (témoin) par injection intrapéritonéale différentes concentrations des extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulu*

m comme indiqués dans la **Figure 12 A et B**. Les résultats montrent que l'œdème maximal obtenu 30 minutes après application de 30 μ l de xylène est significativement inhibé et cela de manière dose dépendante par les deux extraits de polysaccharides des deux plantes. *Anvillea garcinii* est plus efficace que *Zygophyllum gaetulum*, à 300 mg/kg, le taux d'inhibition induit par Les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* est respectivement de $61,21 \pm 7,347$ % et $45 \pm 8,461$ % (**Figure 12 A et B**).

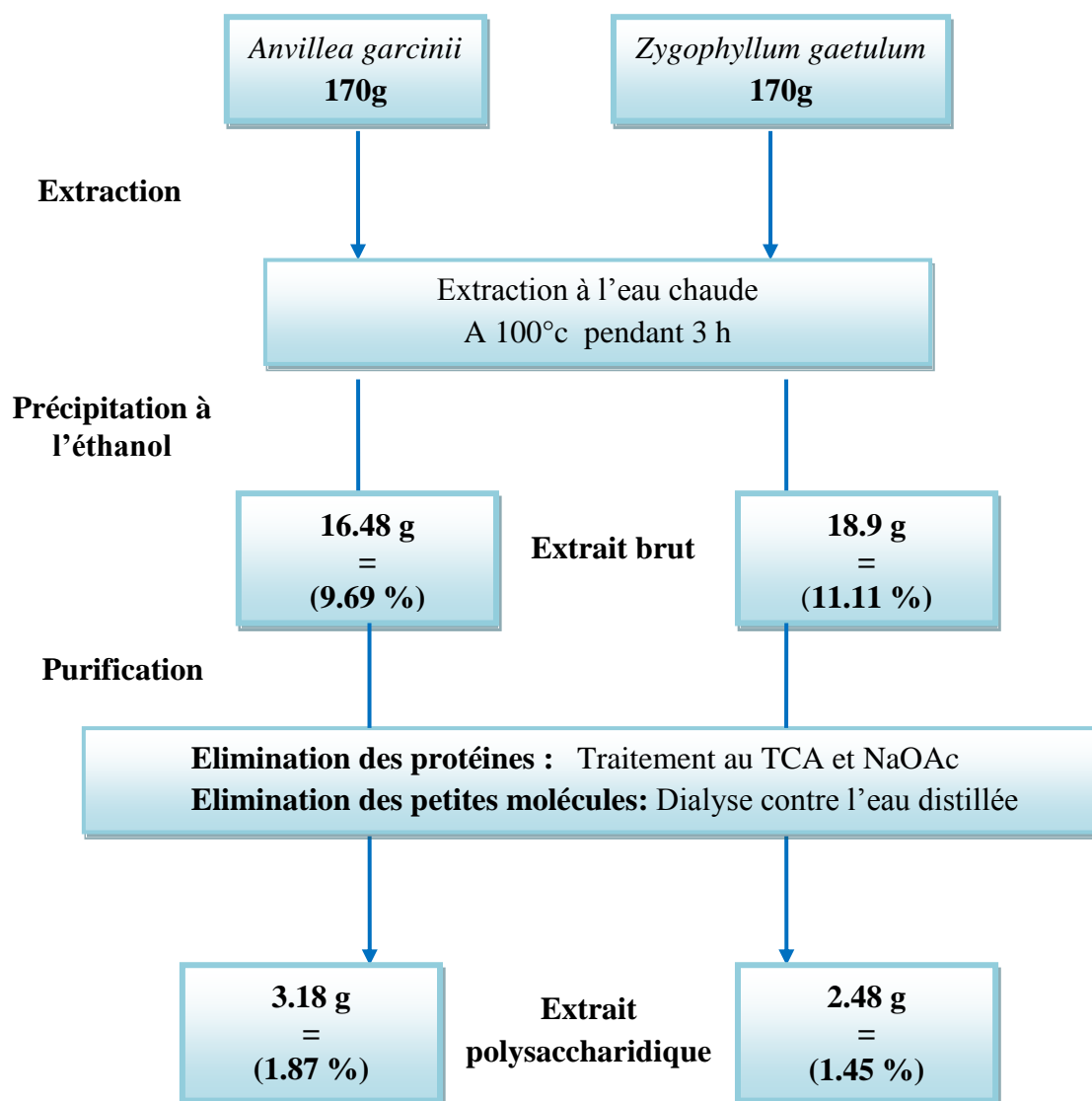


Figure 11. Les étapes de l'extraction des polysaccharides totaux.

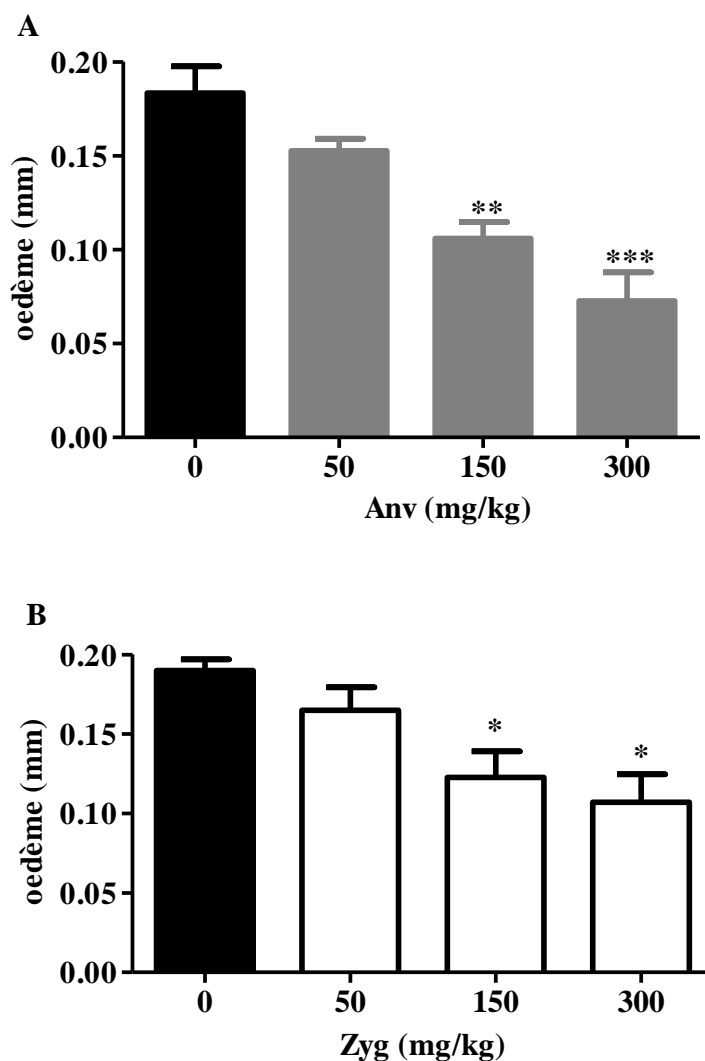


Figure 12. Effet anti-inflammatoire des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothallum gaetulum*

L'effet des fractions de polysaccharides contre l'inflammation aiguë a été étudié en utilisant le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris suivant Les souris ont été traité par injection intrapéritoneale avec 0.9 % de NaCl pour le témoin ou avec 50, 150 ou bien 300 mg/kg des extraits de Zyg ou Anv, 24 heures et une heure avant l'application de 30 μ l de xylène sur la surface antérieure et postérieure de l'oreille droite. L'augmentation de l'épaisseur provoquée par le xylène a été mesurée en soustrayant l'épaisseur de l'oreille mesurée avant et après l'application du xylène. A: Taux de diminution de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par les différentes concentrations de *Anvillea garcinii* comparées avec le groupe témoin considéré comme le 100% de l'œdème. B: Taux de diminution de l'épaisseur de l'oreille chez les souris traitées par les différentes concentrations de *Zygothallum gaetulum* comparées avec le groupe témoin considéré comme le 100% de l'œdème. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM de 3 essais indépendants. *: $p < 0,05$, **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle (Ctl) non traité (Tukey test).

2.4.Effet des extraits polysaccharidiques sur la production des FRO par le sang humain total et les phagocytes humains

Nous avons également étudié si les extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymum gaetulum* peuvent avoir un effet régulateur sur la production des FRO par le sang total et les phagocytes humaine qui ont un rôle très important dans le processus inflammatoire. Des échantillons de sang frais (dilués à 1/400 μ l) provenant de volontaires sains, des monocytes (2×10^5) ou des neutrophiles (5×10^5) isolés ont été mis en incubation pendant 15 minutes à 37°C avec 300 μ g/ml des extraits de polysaccharides avant d'effectuer une stimulation avec fMLF. La production des FRO dans le sang total est mesurée par chimioluminescence amplifiée en utilisant le luminol en présence de la HRPO. Les résultats présentés dans la **Figure 13** (A) montrent que le taux de production des FRO du sang total induite par 10^{-7} M de fMLF (Témoin) peut être inhibé en présence d'extrait issu des deux plantes. L'aires sous ces courbes (CPM) sont représentés par les histogrammes dans la **Figure 13.B**. *Anvillea garcinii* est un puissant inhibiteur de la production de FRO par le sang total comparé à *Zygothymum gaetulum*. D'autre part, nous avons analysé si cette inhibition de la production des FRO en réponse au fMLF est présente chez les phagocytes ; neutrophiles (**Figure 14 B**) et monocytes. (**Figure 14 A**). La **Figure 14 (A et B)** montre qu'*Anvillea garcinii* est toujours la plus efficace que *Zygothymum gaetulum* à inhiber la production des FRO des deux types cellulaire. *Anvillea garcinii* a inhibé 81.40 ± 1.380 % et 51.96 ± 8.898 % de la production des FRO induite par le fMLF par les monocytes et les neutrophiles respectivement.

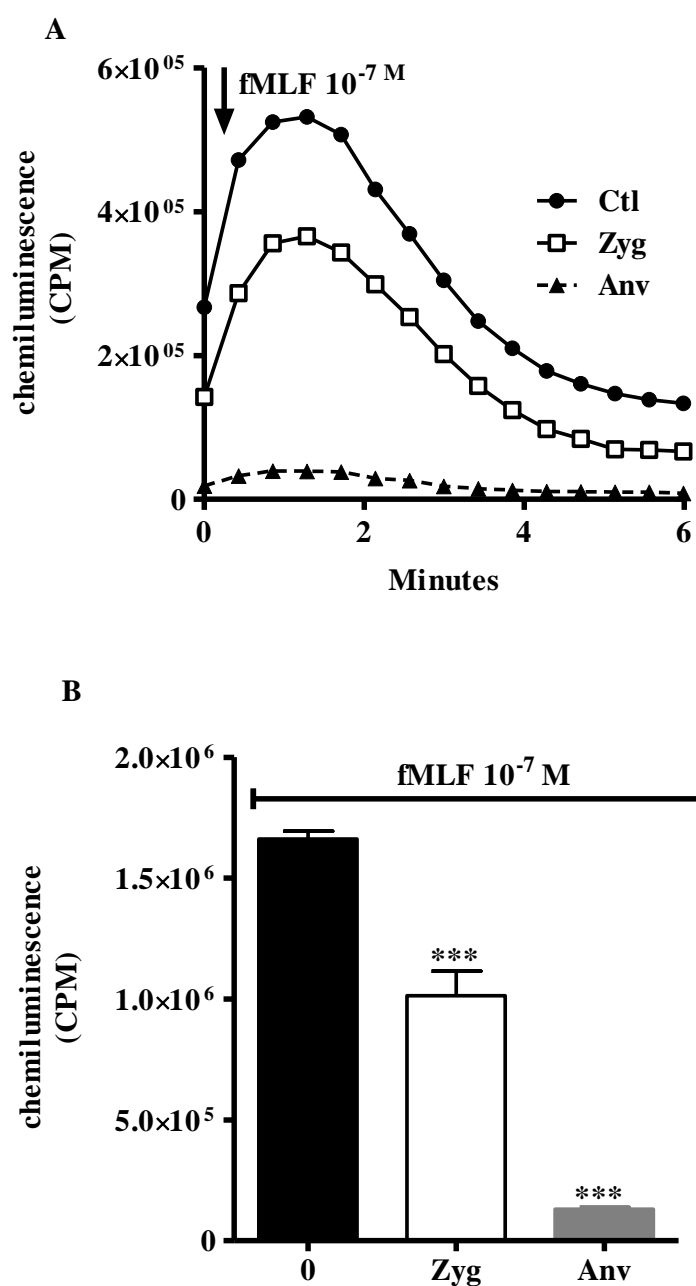


Figure.13. Inhibition de la production des FRO par le sang humain total activé sous l'effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygodphyllum gaetulum*.

Le sang humain total (une dilution de 1/400 μ l dans le HBSS contenant 10 μ M de luminol et 0,5 U de HRPO) est incubé 15 minutes à 37°C en présence ou en absence de 300 μ g/ml des polysaccharides extraits à l'eau chaude de Zyg ou d'Anv avant la stimulation par le fMLF (10^{-7} M). La chimioluminescence amplifiée par le luminol en présence de la HRPO est mesurée pendant 15 minutes. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM de plus que 3 essais indépendants. *: $p < 0,05$, **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle (Ctl) non traité (Tukey test).

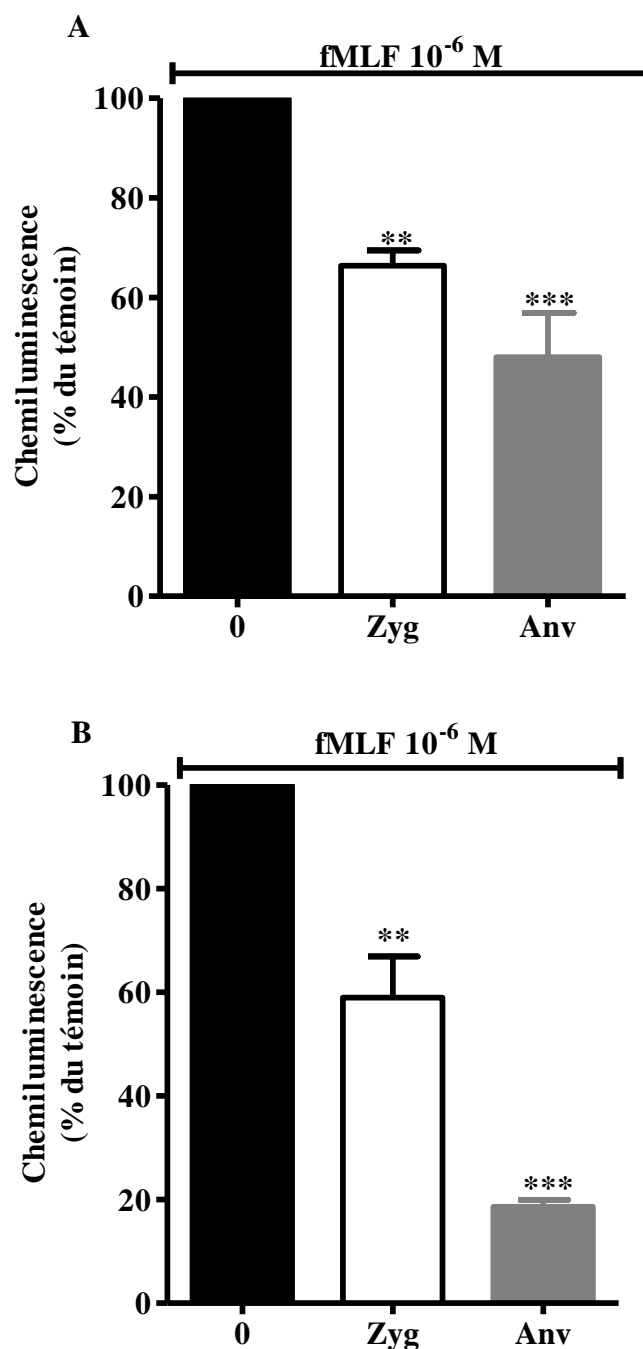


Figure.14. Inhibition de la production des FRO par les neutrophiles et les monocytes activés sous l'effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygodophyllum gaetulum*.

2×10^5 de monocytes (A) et 5×10^5 de neutrophiles (B) sont préincubés dans 500 μ l de HBSS contenant 10 μ M de luminol à 37°C en présence ou en absence de 300 μ g/ml des polysaccharides extraits à l'eau chaude de Zyg ou d'Anv pendant 15 min avant d'être stimulés par 10^{-6} M de fMLF et la chimiluminescence amplifiée par le luminol est mesurée durant 15 min. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM de plus que 3 essais indépendants. *: $p < 0,05$, **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.005$, comparaisons effectuées par rapport au contrôle non traité (0) (Tukey test).

2.5. Effet des extraits polysaccharidiques sur la production des FRO par les neutrophiles humains

Afin d'explorer le mécanisme régulateur des extraits de *Zygophyllum gaetulum* et *Anvillea garcinii* sur la production des FRO, les neutrophiles au repos ont été utilisés. La **Figure 15 (A et B)** montre que les différentes concentrations des extraits des deux plantes peuvent inhiber de manière dose dépendante la production des FRO par les cellules au repos, *Anvillea garcinii* est la plus efficace. La **Figure 15 (C et D)** montre que ces extraits sont aussi capables d'inhiber de manière dose dépendante la production des FRO par les neutrophiles isolés stimulés par le fMLF ou par le PMA, un agoniste de PKC. Comme pour les cellules au repos, *Anvillea garcinii* est plus puissante dans le cas des neutrophiles stimulés par ~~les~~ le fMLF ou le PMA. Un effet inhibiteur similaire est observé avec les deux stimulateurs utilisés suggérant l'implication de multiples voies. Comme le fMLF et le PMA activent la NADPH oxydase par différentes voies de transduction, les résultats obtenus suggèrent que les polysaccharides extraits de *Zygophyllum gaetulum* et *Anvillea garcinii* inhibent directement une cible finale commune entre le fMLF et le PMA telle que la NADPH oxydase ou la MPO, ou qu'il scavenges les FRO.

2.6. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la viabilité des neutrophiles humains

Afin de vérifier que les activités observées des extraits de polysaccharides ne sont pas dues à un effet cytotoxique sur les neutrophiles humains, la viabilité de ces derniers a été évaluée par cytométrie en flux en utilisant le Kit Guava ViaCount Reagent et en suivant strictement les instructions du fabricant. Les résultats présentés dans la **Figure 16 A et B** montrent que, jusqu'à la dose la plus élevée utilisée dans nos essais, les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* n'ont aucun effet sur la viabilité des neutrophiles humains.

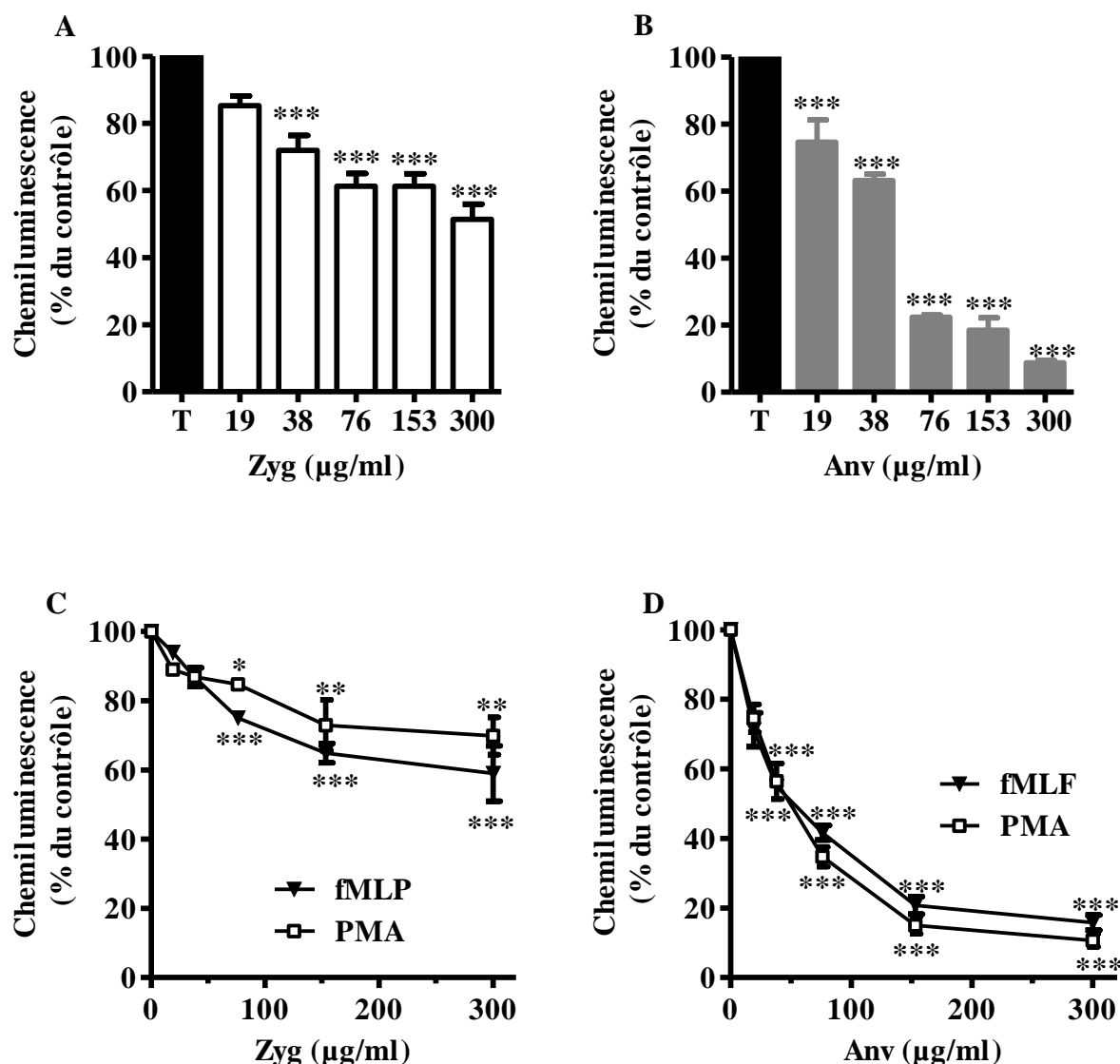


Figure 15. Effet des extraits polysaccharidiques sur la production des FRO par les neutrophiles humains.

Les neutrophiles humains fraîchement isolés (5×10^5) ont été incubés dans du HBSS en l'absence ou en présence de différentes concentrations des polysaccharides extraits de *Zygophyllum gaetulum*(A) ou *Anvillea garcinii* (B) pendant 15 min à 37°C . La production de FRO a été mesurée en utilisant l'essai de chimioluminescence amplifié par le luminol ($10 \mu\text{M}$). Les expériences suivantes ont été réalisées en incubant les neutrophiles humains avec des concentrations similaires de *Zygophyllum gaetulum* (C) ou *Anvillea garcinii* (D) pendant 15 min à 37°C avant d'ajouter soit du fMLP (10^{-6}M) ou du PMA (100ng/ml). La production des FRO est mesurée pendant 30 minutes en utilisant l'essai de chimioluminescence amplifié par le luminol ($10 \mu\text{M}$). Les données ont été exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs témoins sans fMLP ou PMA. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM d'au moins trois expériences séparées et sont comparées par rapport au contrôle non traité (T ou 0). *: $p < 0,05$, **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.005$, (Tukey test).

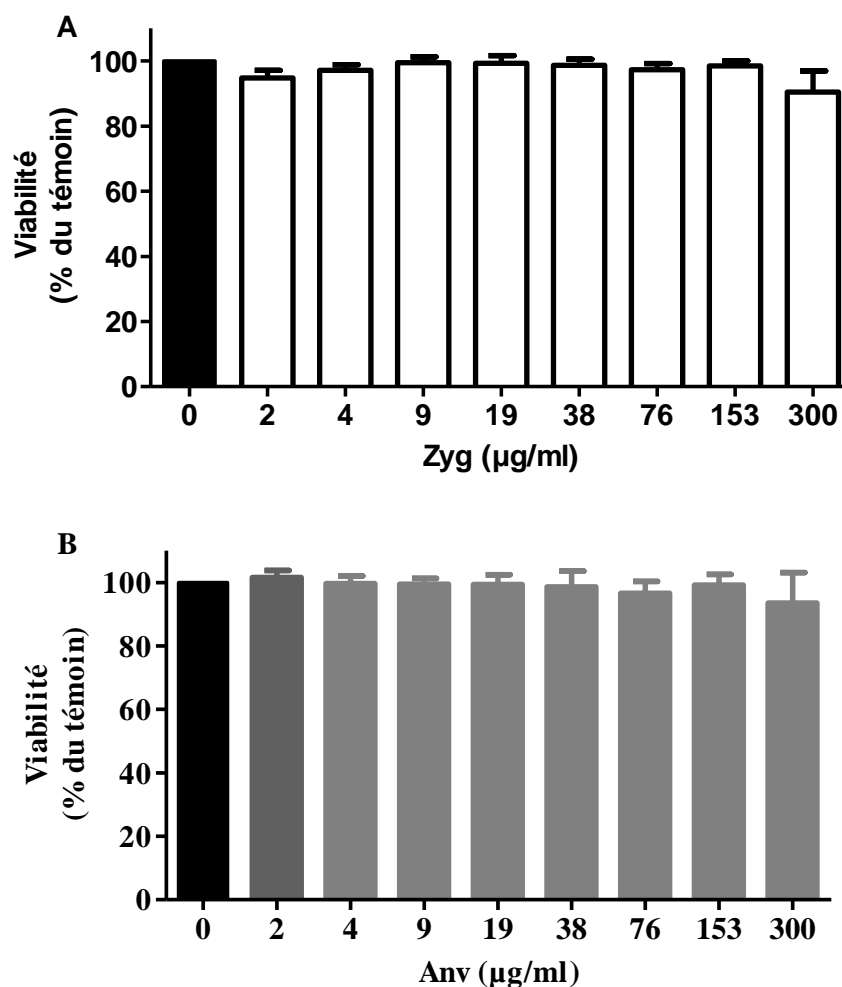


Figure 16. Effet des extraits polysaccharidiques d'*Anvillea garcinii* et de *Zygodhryllum gaetulum* sur la viabilité des neutrophiles humains.

*24x10⁴ PMNs / 60 µl de HBSS sont incubées 30 minutes à 37 °C en présence ou en absence de différentes concentrations des extraits de polysaccharides. La distinction entre les cellules viables et non viables est déterminée par la perméabilité différentielle des colorants de liaison à l'ADN dans le réactif Guava ViaCount (IFAS-Cytometry Bioscience, Millipore). La viabilité est exprimée en pourcentage par rapport au témoin non traité par les extraits de polysaccharides. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM de trois expériences séparées et sont comparés par rapport au contrôle non traité (0). *: p < 0,05, **: p < 0.01 ***: p < 0.005, (Tukey test).*

2.7. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la production d'anions superoxydes par le neutrophile humain

La production du $O_2^{\bullet-}$ par les neutrophiles incubés en absence (témoin) ou en présence de différentes concentrations des extraits de polysaccharides pendant 15 minutes et stimulés par le fMLF (10^{-6} M) ou par le PMA (100 ng/ml), a été déterminée par la méthode de réduction du cytochrome C. Cette méthode permet de mesurer spécifiquement les anions $O_2^{\bullet-}$ libérés dans le milieu extracellulaire (Markert *et al.*, 1984). Les polysaccharides extraits de *Zygophyllum gaetulum* inhibent faiblement la production de $O_2^{\bullet-}$ de neutrophiles humains stimulés par le fMLF ou le PMA (**Figure 17 A**). Les extraits d'*Anvillea garcinii* inhibe efficacement et de manière dose dépendante la production de $O_2^{\bullet-}$ par les neutrophiles stimulés par le PMA a comparé a la stimulation par le fMLF (**Figure 17 B**). Cela suggère que les extraits d'*Anvillea garcinii* affectent l'activité de la NADPH oxydase par l'inhibition de l'activité des isoformes de la PKC (**Figure 17 B**).

2.8. Evaluation de l'activité « scavenger » de l' H_2O_2

Afin d'étudier l'effet « scavenger » de H_2O_2 , 0.8 mM de ce dernier sont incubés 10 minutes dans un volume final de 500 μ l du tampon HBSS en absence (témoin) ou en présence de différentes concentrations de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* à température ambiante. La mesure de la quantité de H_2O_2 est effectuée dans un luminomètre juste après le déclenchement de la réaction par l'ajout de 0.16 U de l'HRP. Les résultats présentés dans la **Figure 18 B** montrent que *Anvillea garcinii* scavenge le H_2O_2 à partir de la concentration 153 μ g/ml, tandis que *Zygophyllum gaetulum* n'est que faiblement actif à partir de 300 μ g/ml (**Figure 18 A**).

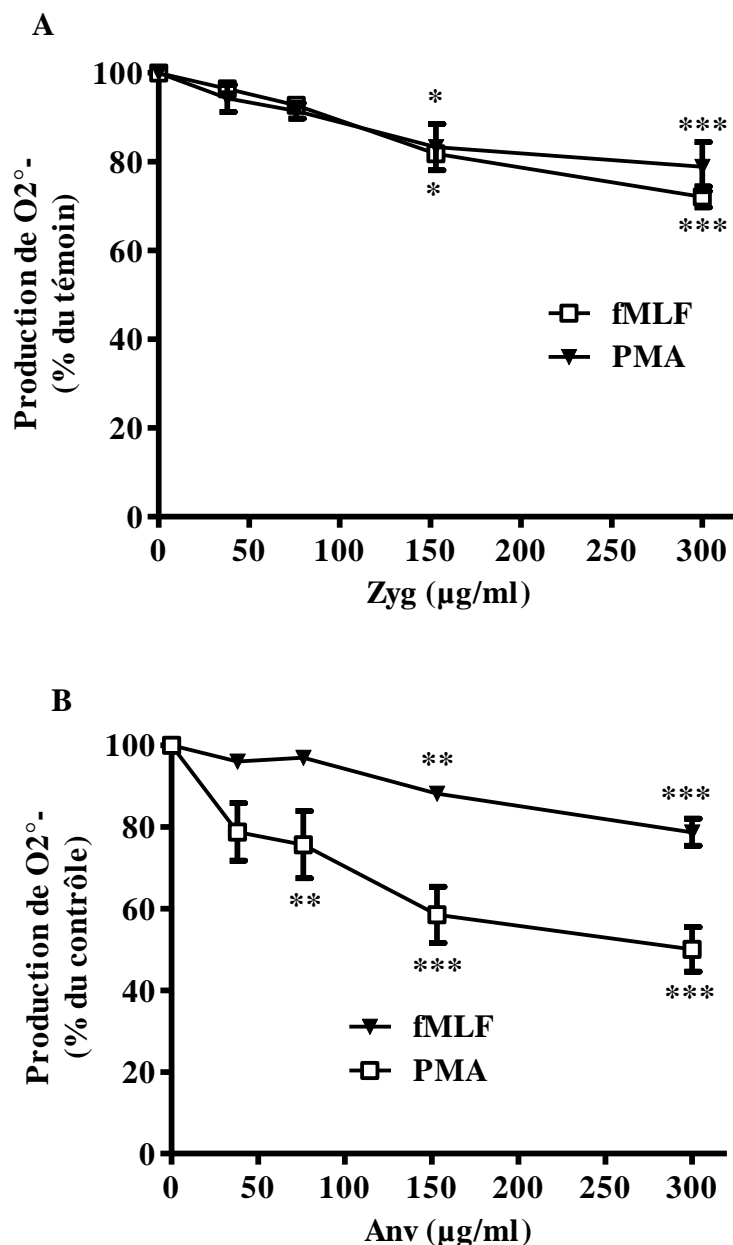


Figure 17. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothallum gaetulum* sur la production d'anions superoxydes par le neutrophile humain.

Les neutrophiles humains (5×10^5 dans $500 \mu\text{l}$ de HBSS) sont incubés à 37°C pendant 15 minutes en présence ou en absence (témoin) de différentes concentrations des extraits de polysaccharides. Ensuite, ils ont été stimulés avec soit du fMLP (10^{-6} M) soit du PMA (100 ng / ml). La production d'anions superoxydes a été mesurée en utilisant la méthode de réduction du cytochrome C à 550 nm pendant 10 minutes. La quantité de superoxyde produit est exprimée en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues avec les neutrophiles non traités et stimulés par le fMLP ou le PMA. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM d'au moins trois expériences séparées. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,005$, (Tukey test).

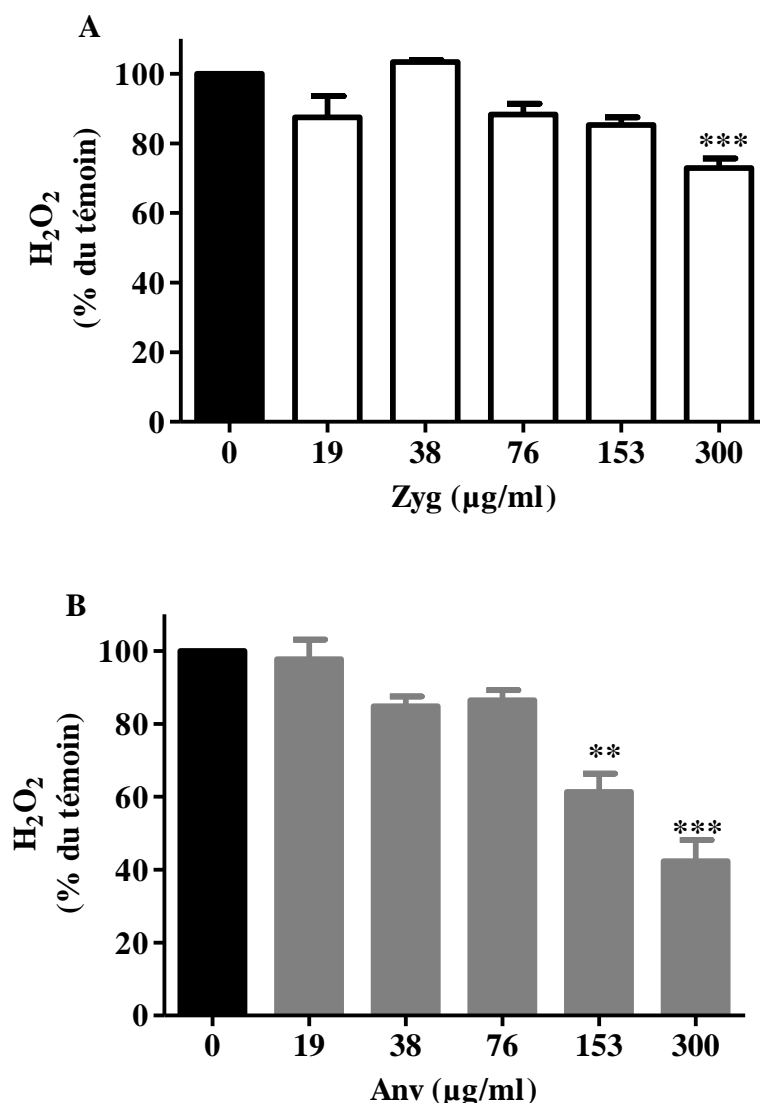


Figure 18. Effet scavenger de H₂O₂ sous l'effet des extraits polysaccharidiques.

H₂O₂ (0.8mM) est incubé en présence ou en absence de différentes concentrations des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygodium gaetulum* à température ambiante durant 10 minutes. L'HRPO est ajouté et la quantité de l'H₂O₂ est mesurée durant 20 minutes en utilisant l'essai de la chimioluminescence amplifié par le luminol. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs du témoin (0). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM de quatre expériences séparées. **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.005$, (Tukey test).

2.9. Evaluation de l'activité « scavenger » de l'anion superoxyde

Afin de vérifier que les extraits de polysaccharides inhibent réellement la production d'anions superoxydes par le neutrophile humains sans que cet effet soit dû à une propriété « scavenger » de ces extraits vis-à-vis de l'anion superoxyde. L'essai de réduction du cytochrome C dans le système acellulaire xanthine/xanthine oxydase a été réalisé en absence (Témoin) et en présences des différentes concentrations de polysaccharides. Les résultats,

présentés dans la Figure 19 (A et B), montrent que la production d'anions superoxydes n'a pas été réduite par aucune des doses des extraits de polysaccharides utilisées, démontrant qu'ils sont dépourvus d'activité « scavenger » vis-à-vis de l' $O_2^{\bullet-}$.

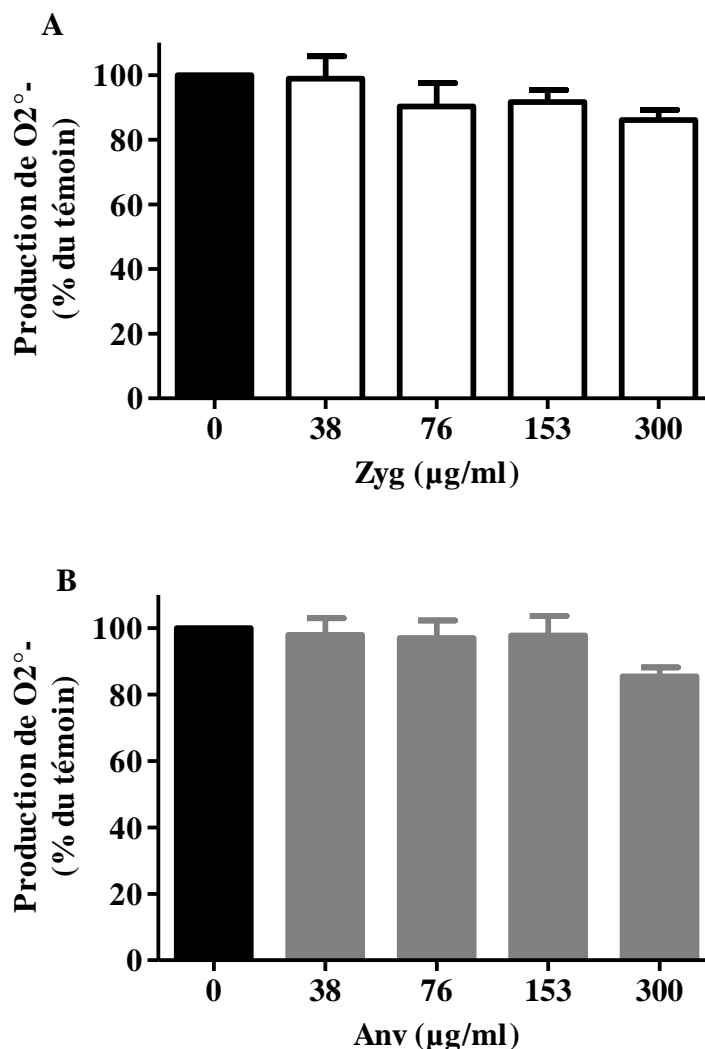


Figure 19. Effet scavenger des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothallum gaetulum* vis-à-vis de l'anion superoxyde.

Le substrat de génération de l' $O_2^{\bullet-}$ et la cytochrome C sont incubés avec différentes concentrations des extraits de *Zygothallum* (A) et d'*Anvillea garcinii* (B) à 30°C durant 15 minutes. L'enzyme xanthine oxidase est ajoutée et la quantité de l'anion superoxyde a été mesurée par le dosage de la réduction du cytochrome C à 550 nm dans un spectrophotomètre. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs du témoin (0). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne SEM de quatre expériences séparées.

2.10. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothallum gaetulum* sur la translocation des PKC β et p47^{phox} vers la membrane du neutrophile en réponse au PMA

Dans les PMN au repos, les composantes de la NADPH oxydase sont distribuées entre le cytosol et la membrane plasmique. L'activation de la NADPH oxydase du neutrophile implique la phosphorylation des composantes cytosoliques, notamment la p47^{PHOX}, suivie par leur translocation vers la membrane et leur association au cytochrome b558 pour former une oxydase active. La capacité des extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothallum gaetulum* pour inhiber la translocation de la PKC et la p47^{phox} vers la membrane des neutrophiles stimulés par le PMA, un activateur direct de certaines isoformes de la PKC, a été étudiée. L'analyse, par Western blot, des fractions membranaires obtenues des neutrophiles prétraités par les extraits et stimulés par le PMA, montre que ce dernier induit une translocation nette de la p47^{PHOX} et de la PKC en comparaison aux neutrophiles en repos (**Figure 20 A1 et B1**). La p22 ^{PHOX} qui fait partie du cytochrome b558 est présente dans les membranes des cellules en repos et y reste après stimulation, alors qu'elle est totalement absente dans le cytosol. Sa quantité dans la membrane est constante : ce qui nous permet de l'utiliser comme contrôle de charge. Les résultats présentés dans la **figure 20 A et B** montrent aussi que *Anvillea garcinii* et de *Zygothallum gaetulum* sans incapables d'induire la translocation PKC ou de la p47^{phox} dans l'état de repos, comme indiqué dans le Western Blot (**Figure 20 A1 et B1**). La **Figure 20 A2 et B2** (histogrammes) montre que le traitement des neutrophiles par 300 $\mu\text{g/ml}$ d'*Anvillea garcinii* a inhibé la translocation de la p47^{PHOX} et de la PKC β . Ces résultats suggèrent qu'*Anvillea garcinii* a un effet sur l'assemblage de la NADPH oxydase dans les neutrophiles stimulés par le PMA. *Zygothallum gaetulum* ne présente aucun effet sur la translocation de la p47^{PHOX} et de la PKC β en réponse au PMA.

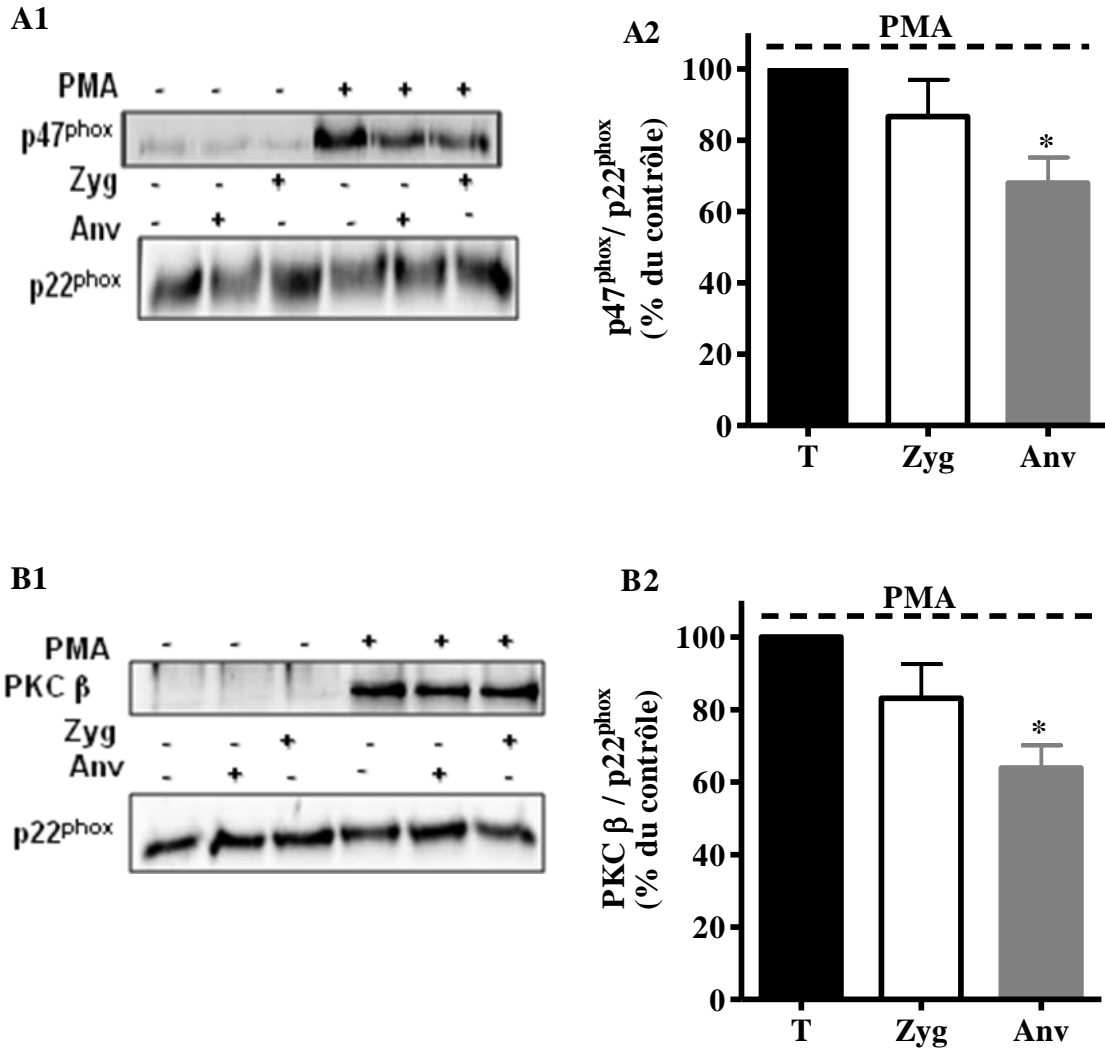


Figure 20. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la translocation de la p47^{PHOX} et de la PKC β.

Les neutrophiles (50×10^6 Neuts/ml) sont pré-incubés 15 minutes à 37 °C en présence ou en absence de 300 µg/ml d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* avant d'être stimulés pendant 8 minutes par le PMA (100 ng/ml). Après arrêt de la stimulation par du PBS glacé, les cellules sont lysées puis soumises à un fractionnement cellulaire par ultracentrifugation sur un gradient discontinu de sucrose. Les fractions cytosoliques et membranaires sont dénaturées dans du tampon Laemmli, soumises à une SDS-PAGE ($2,5 \times 10^6$ eq. cell/puits), puis analysées par Western blot avec un anticorps anti- p47^{phox} (A) ou anti-PKC β (B) et un anticorps anti-p22^{phox} Ac (p22^{phox}). Les Western blots de différentes expériences ont été scannés et l'intensité de la translocation de la p47^{phox} et de la PKC β a été exprimée par rapport à la quantité de la protéine p22^{phox}. Les données accumulées sont représentées dans l'histogramme en tant que pourcentage de témoin (T) (PMA seul). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM d'au moins trois expériences séparées. *: $p < 0,05$ (Tukey test).

2.11. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la phosphorylation de la Ser328 de la p47^{phox}

Pour que la NADPH oxydase soit catalytiquement active, les composantes cytosoliques doivent être phosphorylées, en réponse à une stimulation appropriée, pour être capables de rejoindre les composantes membranaires et former le complexe NADPH actif. La plupart des composants de la NOX2 sont plus ou moins phosphorylés durant le processus d'activation. La phosphorylation de la p47^{PHOX} est un évènement crucial à l'activation de la NADPH oxydase. Afin de voir si les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* interfère avec la phosphorylation des composés cytosoliques de la NADPH oxydase un évènement crucial à l'activation de ce dernier, nous avons analysé son effet sur la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur la Ser328. Les résultats illustrés dans la **Figure 21** montrent que le PMA induit une forte phosphorylation de la p47^{PHOX} sur Ser328 en comparaisons au PMN non stimulés. Cette phosphorylation est significativement inhibée par *Anvillea garcinii* a 300 µg/ml tandis que *Zygophyllum gaetulum* n'a pas d'effet (**Figure 21 A et B**). L'analyse par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre la p47^{PHOX} non phosphorylée permet de s'assurer que la même quantité de protéine a été déposée dans chaque puit de la SDS-PAGE. Les bandes ont été quantifiées par densitométrie et les rapports entre les phospho-p47^{PHOX} et les p47^{PHOX} totales ont été calculés. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur la Ser328 par *Anvillea garcinii* est en partie responsable de la diminution de la production des anions superoxydes par la NADPH oxydase dans les neutrophiles stimulés par le PMA.

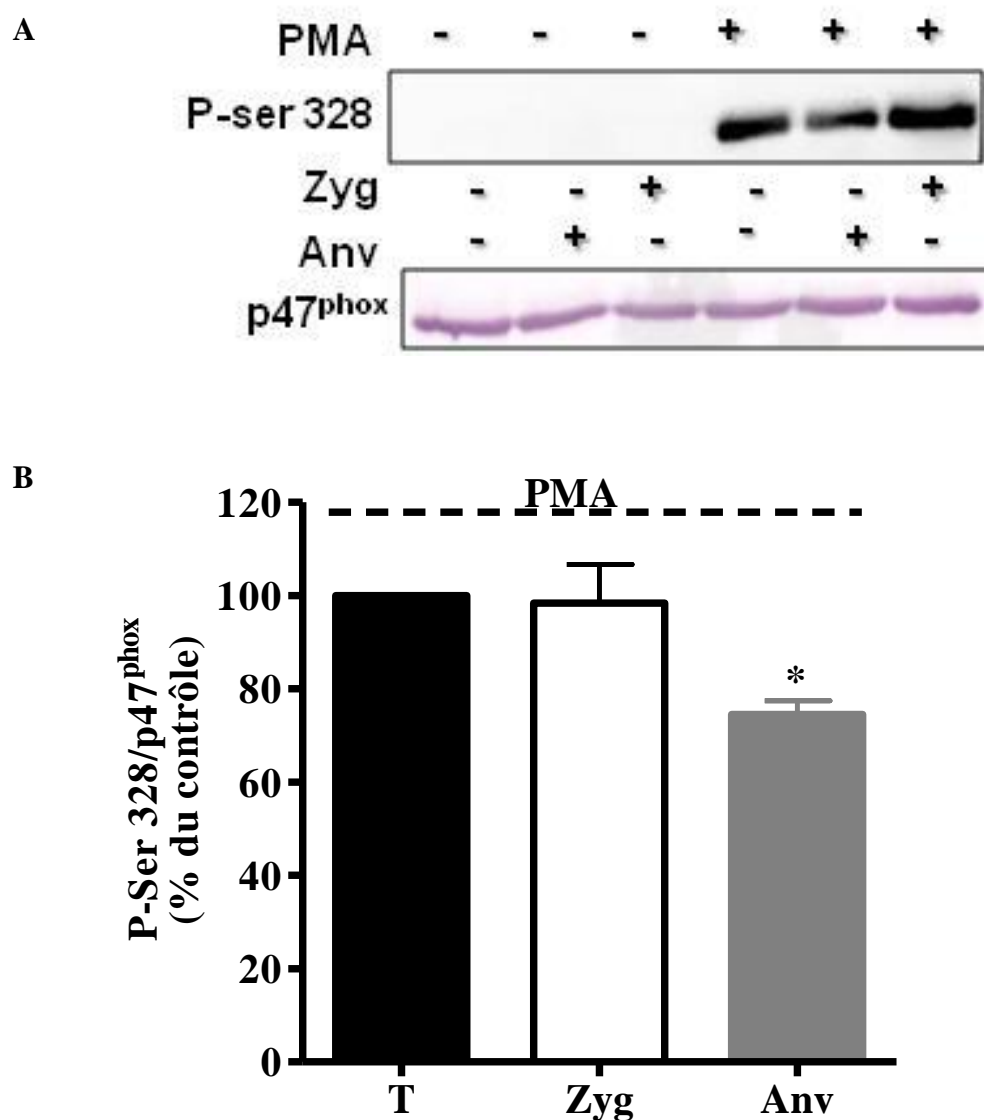


Figure 21. Effet de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygodophyllum gaetulum* sur la phosphorylation de la p47^{PHOX} sur la sérine 328.

Les neutrophiles (5×10^6 dans $500 \mu\text{l}$ de HBSS) sont incubés pour 15 minutes à 37°C en absence (témoin) ou en présence de $300 \mu\text{g/ml}$ de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygodophyllum gaetulum* avant d'être stimulés pendant 8 minutes à 37°C par le PMA (100 ng/ml). Après arrêt de la stimulation par du tampon Laemmli 5X et 5 minutes de dénaturation à 100°C , les lysats cellulaires sont soumis à une SDS-PAGE de 10% (4×10^5 eq. cell/puit) puis analysés par Western Blot en utilisant des anticorps spécifiques anti-phospho-Ser328-p47^{PHOX}. Les membranes sont réincubées avec les anticorps anti-p47^{PHOX} utilisés comme contrôle de charge. Les bandes sont quantifiées et les rapports entre l'intensité des phospho-p47^{PHOX} et celle de la p47^{PHOX} totale sont calculés. Les valeurs sont une moyenne de 3 essais indépendants \pm SEM. * : $p < 0,05$, comparaisons effectuées par rapport au témoin (T) non traité par les extraits de polysaccharides (PMA seul).

2.12. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la phosphorylation de ERK (1/2) et p38 MAPKinase de neutrophiles stimulés par le PMA

Les MAPK, en particulier ERK1/2 et p38 MAPK, sont impliquées dans diverses fonctions du neutrophile induites par le fMLF ou le PMA, notamment la phosphorylation des composantes de la NADPH oxydase et la dégranulation. Afin d'explorer davantage les mécanismes possibles de l'inhibition des fonctions du neutrophile par les polysaccharides observés, nous avons analysé l'effet de ces extraits sur l'activation des MAP Kinases (ERK1/2 et p38 MAPK) dans les neutrophiles stimulés par le PMA en utilisant des anticorps anti-phospho MAPK. Les résultats obtenus, illustrés dans la **Figure 22 (A1 A2 et B1 B2)**, montrent que la forte phosphorylation de ERK1/2 et de p38 MAPKinase induite par le PMA a été significativement réduite par 300 µg/ml d'*Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum* n'a pas d'effet significatif sur ces voies de signalisations (**Figure 22 A1 A2 et B1 B2**).

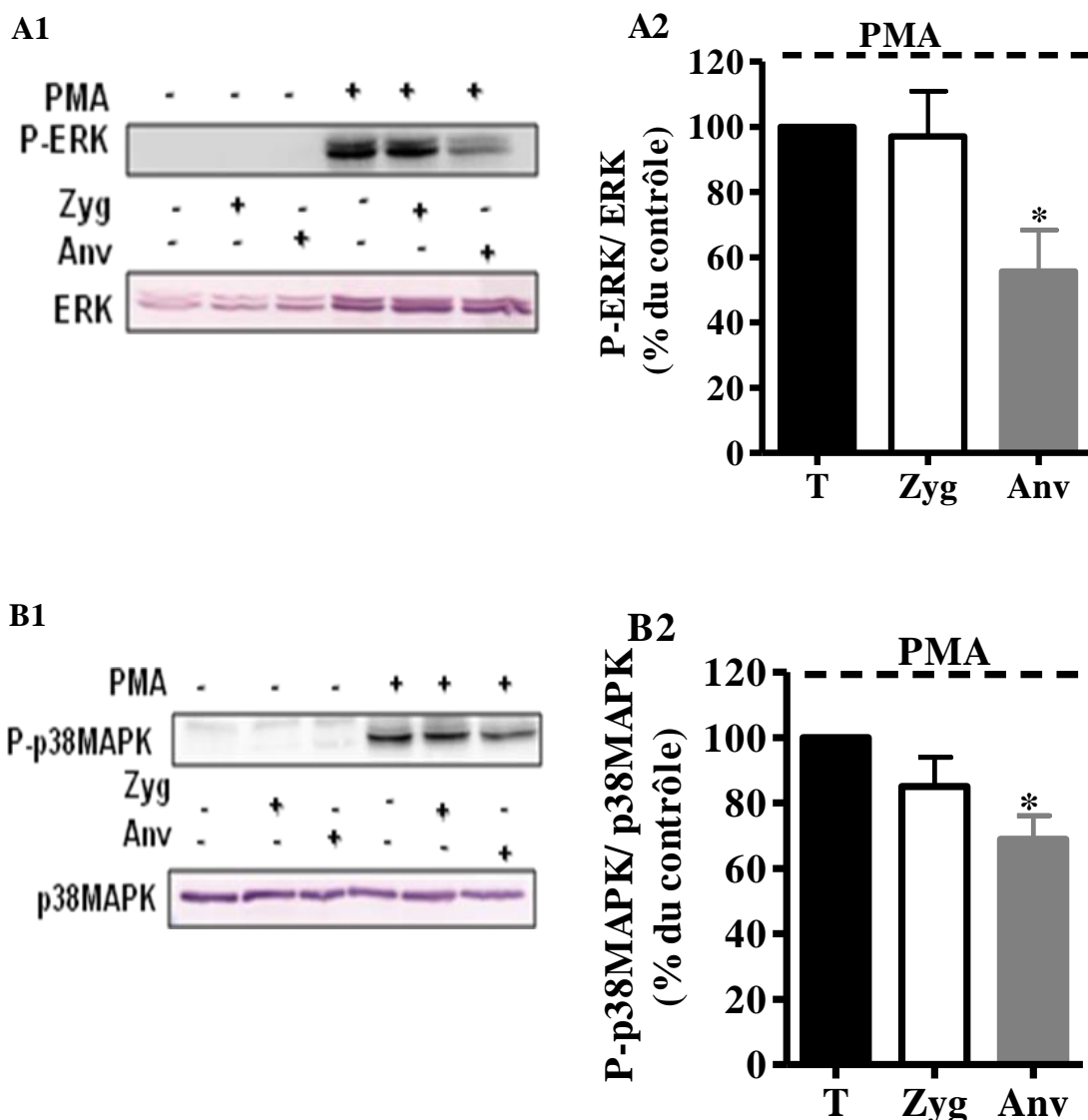


Figure 22. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la phosphorylation de ERK (1/2) et p38 MAPKinase.

Les PMN (5×10^6 dans $500 \mu\text{l}$ de HBSS) sont incubés pendant 15 minutes à 37°C en absence ou en présence de $300 \mu\text{g/ml}$ de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* avant d'être stimulés pendant 8 minutes à 37°C par le PMA (100 ng/ml). Après dénaturation dans le tampon Laemmli 5X, les échantillons sont soumis à une SDS-PAGE de 10% ($4 \times 10^5 \text{ eq.cell/puit}$) puis analysés par Western blot en utilisant des anticorps antiphospho- ERK1/2 et anti-phospho-p38 MAPK. Les membranes sont reblottées avec les anticorps anti-ERK1, anti-ERK2 et anti-p38 MAPK, utilisées comme contrôle de charge. Les rapports entre les bandes des phospho-ERK1/2 ou phospho-p38 MAPK et celles des ERK1/2 ou des p38 MAPK totales sont déterminés. Les valeurs sont une moyenne de 3 essais indépendants \pm SEM.; * : $p < 0,05$, comparaisons effectuées par rapport au témoin stimulé par le PMA et non traité par les extraits de polysaccharides (T).

2.13. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygodium gaetulum* sur la dégranulation des neutrophiles

c) Analyse de la myéloperoxydase par Western blot

L'exocytose des granules azurophiles et spécifiques joue un rôle important dans diverses fonctions du neutrophile humain. L'effet des extraits de polysaccharides sur la libération des granules azurophiles induite par le fMLF ou le PMA a été évalué en mesurant la libération extracellulaire de la myéloperoxydase (MPO), l'enzyme pro-inflammatoire le plus abondant stocké dans les granules azurophiles des neutrophiles, dans les surnageants cellulaires. L'analyse de ces surnageants par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la MPO montre que lorsque le PMA a été utilisé comme agoniste pour la dégranulation, seule *Anvillea garcinii* à la concentration la plus élevée (300 µg/ml) exerce un effet inhibiteur puissant sur la libération de la MPO dans le milieu extracellulaire (**Figure 23 B1, B2**). Cependant, les résultats présentés dans la **Figure 23 A1 et A2**, montrent que les extraits des deux plantes utilisés étaient efficaces pour inhiber la libération de la MPO dans le milieu extracellulaire en réponse à fMLF.

d) Analyse de l'expression membranaire des neutrophiles du CD11b par cytométrie en flux

La stimulation de neutrophile entraîne une mobilisation des granules spécifiques vers la membrane plasmique associée à une augmentation de l'activité de l'oxydase. Toute inhibition du processus de dégranulation contribuerait ainsi à la réduction de la génération du $O_2^{\cdot-}$ par la NADPH oxydase. Nous avons donc étudié l'effet des extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygodium gaetulum* sur la libération des granules spécifiques par mesure de l'expression de du CD11b, contenus dans ces granules, à la surface du neutrophile par Cytométrie en flux. Dans la **Figure 24**, les données obtenues sont représentées en pourcentage par rapport aux valeurs témoins (fMLF seule) et montrent que les deux plantes étaient capables de réduire significativement l'expression membranaire du CD11b en réponse au fMLF.

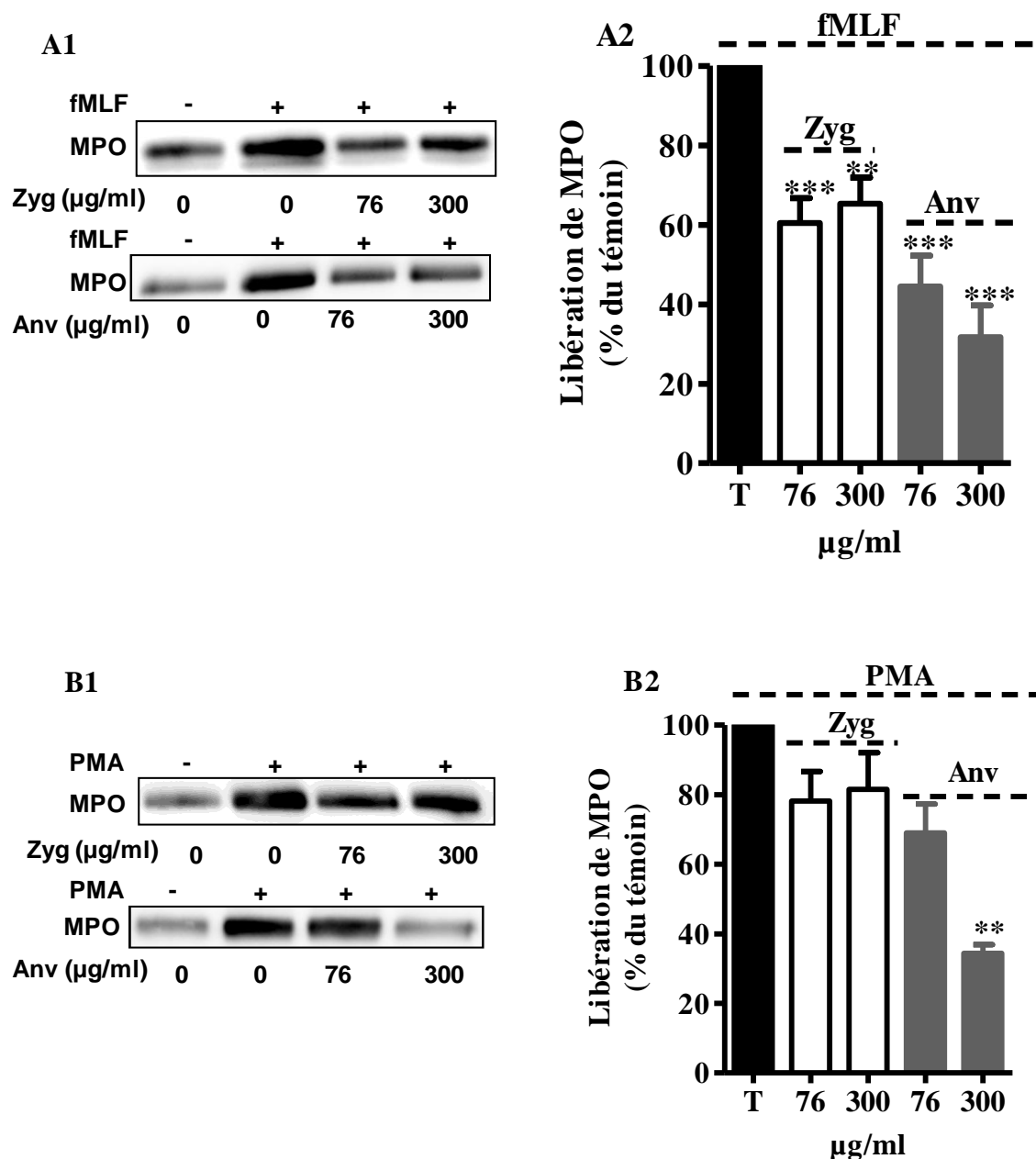


Figure 23. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* sur la dégranulation des granules azurophiles des neutrophiles.

L'effet des polysaccharides sur la libération des granules azurophiles est déterminé en mesurant la libération de la MPO. Les neutrophiles ($5 \times 10^6/\text{ml}$ dans $500 \mu\text{l}$ de HBSS) préalablement traités pendant 15 minutes avec différentes concentrations de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygophyllum gaetulum* à 37°C , sont soumis à une stimulation de 5 minutes par du fMLF (10^{-6}M) (A1, A2) ou par 100 ng/ml PMA pendant 15 min à 37°C (B1, B2). Les neutrophiles sont éliminés par centrifugation rapide de 8 minutes à 2000 rpm et à 4°C et le surnageant est analysé par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la MPO. Les résultats de la quantification sont présentés par l'histogramme en bas. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 expériences indépendantes \pm SEM. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au témoin (T) non traité par les extraits.

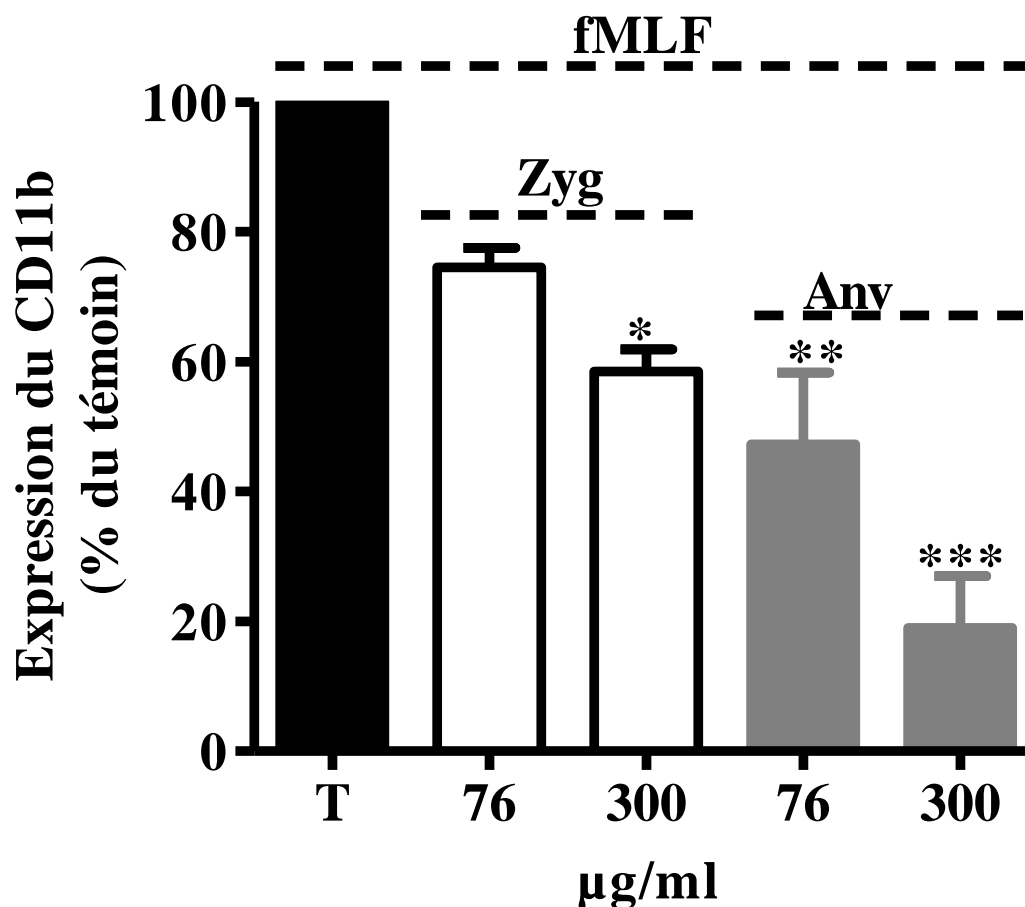


Figure 24. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothallum gaetulum* sur la dégranulation granules spécifiques des neutrophiles.

La libération des granules spécifiques est déterminée en mesurant l'expression membranaire du CD11b. Les neutrophiles ($5 \times 10^6/ml$) sont incubés pendant 15 minutes avec les extraits d'*Anvillea garcinii* ou de *Zygothallum gaetulum* avant d'être stimulés par $10^{-6} M$ de fMLF pour 5 minutes. Les cellules sont par la suite marquées par les anti-CD11b conjugués à la PE puis analysées par cytométrie en flux. Les résultats de la quantification sont présentés par l'histogramme en bas. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 expériences indépendantes \pm SEM. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,005$, comparaisons effectuées par rapport au témoin non traité par les extraits (T).

2.14. Mesure de la libération du calcium intracellulaire dans le neutrophile stimulé par le fMLF

Le calcium joue un rôle important dans l'explosion oxydative dans les phagocytes stimulés par le fMLF. En plus, L'élévation de la concentration cytosolique du Ca^{2+} est très importante dans l'induction de l'exocytose des granules dans une variété de cellules. A cet effet, on a pensé à vérifier l'effet des extraits de polysaccharides sur la mobilisation de calcium cytosolique dans les neutrophiles humains stimulés par fMLF, le Ca^{2+} a été mesuré dans notre étude avec le Fura-2/AM comme décrit dans la partie matériel et méthodes. Les résultats obtenus montrent que *Anvillea garcinii* et *Zygothymum gaetulum* n'ont pas d'effet significatif sur la mobilisation du calcium intracellulaire induite par le fMLF (**Figure 25**).

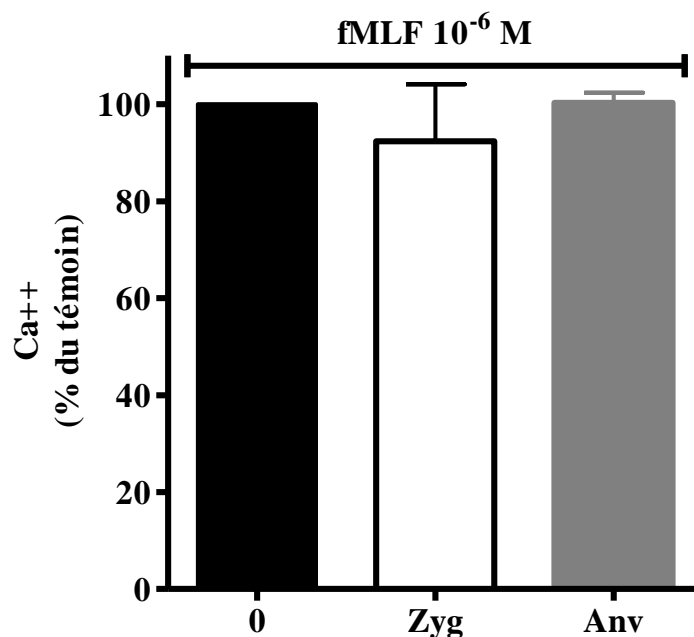


Figure 25. Effet des polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygothymum gaetulum* sur la mobilisation du calcium cytosolique

5 x 10⁶ de neutrophiles resuspendus dans du HBSS ont été chargés avec 5 µmol/l de Fura-2/AM contenant 0.01% d'acide pluronique pendant 30 minutes à 37°C. Après une centrifugation de 8 minutes à 1600 rpm à température ambiante, les cellules resuspendues dans du HBSS sont incubées 15 min à 37 °C en absence ou en présence de différentes concentrations de polysaccharides. Les changements du Ca²⁺ intracellulaire sont mesurés par un fluorimètre à double longueur. Les valeurs sont une moyenne de 3 expériences indépendantes ± SEM. Comparaisons effectuées par rapport au témoin (fMLF seul) (0).

3. DISCUSSION GENERALE

L'immunité innée sert de première ligne de défense essentielle contre les agents pathogènes microbiens et les substances étrangères. Une cascade d'évènements s'enchaîne et se manifeste par un érythème (rougeur), un oedème (gonflement), une sensation de chaleur, une douleur et une impotence fonctionnelle de l'organe touché. L'amplitude de la réponse est cruciale pour éliminer l'agent initiateur et rétablir l'homéostasie. Cette cascade d'évènements, appelée réaction inflammatoire, fait intervenir en première ligne deux types de cellules phagocytaires : les neutrophiles et les monocytes/macrophages. Les cellules phagocytaires et principalement les neutrophiles, premières cellules à rejoindre le foyer inflammatoire, jouent un rôle clé dans l'immunité innée en raison de leur capacité à reconnaître, ingérer et détruire les agents pathogènes par deux mécanismes, un mécanisme dit indépendant de l'oxygène par la libération du contenu microbicide des granules cytoplasmiques (dégranulation) et un mécanisme dit dépendant de l'oxygène par la production de l'anion superoxyde générateur des autres formes réactives de l'oxygène (FRO), comme le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, par le complexe NADPH oxydase, un processus appelé flambée respiratoire ou explosion oxydative (Faurischou et Borregaard, 2003). Ces fonctions des cellules phagocytaires font d'eux un pivot de l'immunité innée et un puissant système de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. La stimulation des neutrophiles et des monocytes par le le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLF) ou le Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) déclenche une cascade de signalisations qui culmine vers l'activation de la NADPH oxydase (NOX2) et la production des FRO (Sheppard *et al.*, 2005). Dans les cellules au repos: les composants cytosoliques (la p67phox, la p47phox, la p40phox et Rac-GDP) et membranaires (la gp91phox et la p22phox qui forment le cytochrome b₅₅₈) de La NADPH oxydase sont dissociés et le système est inactive. Après stimulation des récepteurs, le trimère cytosolique p67phox-p47phox-p40phox migre vers la membrane pour s'associer au cytochrome b₅₅₈, simultanément Rac échange le GDP contre le GTP et le rejoint à la membrane pour former le complexe NADPH oxydase actif qui catalyse la formation de l'anion superoxyde dans la cellule à partir de l'oxygène moléculaire (El Benna *et al.*, 2005; Bréchar *et al.*, 2013). La NOX2 est principalement exprimée dans les phagocytes tels que les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les éosinophiles ainsi que dans les cellules dendritiques (Babior, 1999). Un niveau élevé de FRO qui peut être produit par la NADPH oxydase suite à une

augmentation anormale de l'activité de ce système conduit à de graves conséquences telles que celles observées lors des pathologies inflammatoires et neurodégénératives (Marcoux *et al.*, 2010). Son étroite régulation paraît être d'une importance primordiale. Les produits naturels ont acquis une grande importance comme des agents porteurs d'activité potentielle intéressante. Parmi les plantes Algériennes réputées pour leurs propriétés médicinales figure *Zygophyllum gaetulum*, connue en arabe sous le nom de l'âaggaya, et *Anvillea garcinii* dont le nom arabe est nougd. Ces deux plantes endémiques au Sahara sont utilisées traditionnellement dans le traitement de plusieurs pathologies. Le présent travail est le premier à examiner l'effet des polysaccharides extraits de deux plantes médicinales du Sahara Algérien, *Anvillea garcinii* et *Zygophyllum gaetulum* sur la production des FRO par le complexe NADPH oxydase et à étudier les mécanismes d'action impliqués.

Plusieurs polysaccharides isolés des plantes sont des molécules bio-actives reconnues pour leurs effets thérapeutiques. Ils sont principalement reconnus pour leurs propriétés immunomodulatrices et anticancérigènes, mais également pour leurs propriétés antivirales, antibactériennes, et antiinflammatoires. Les mécanismes d'action ont été élucidés pour certains de ces polysaccharides tel le fucoïdane, un polysaccharide sulfaté d'algues brunes, qui inhibe la réaction inflammatoire chez les lapins. Cette activité a été attribuée à la liaison de polysaccharides à L- ou P-selectines, qui sont des molécules d'adhésion cellulaire essentielles pour le processus de recrutement des leucocytes (Granert *et al.*, 1994). Des polysaccharides d'origine naturelle diminuent significativement l'expression des cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1 β , IL-6 et INF- γ , et peuvent aussi augmenter les cytokines anti-inflammatoires, comme IL-10 et MIP-1 β (Liu et Lin, 2012; Ostergaard *et al.*, 2000). D'autre part, Mebarki *et al.* (2013) ont montré que les polysaccharides extraits *Anvillea radiata* ont un effet antimicrobien. Les propriétés antimicrobiennes de polysaccharides naturels sont dues à leur structure chimique où la présence d'un groupe carbonyle hautement réactif a été détectée. Le groupe carbonyle est capable de lier des amines primaires pour produire une combinaison stable entre les polysaccharides et des protéines (glycoconjugués) (Painter, 1991)

Lorsque le composant bactérien, le fMLF, a été utilisé dans notre étude pour stimuler la production des FRO par le sang humain total ou par les phagocytes, cette production est fortement inhibée par les polysaccharides extraits à l'eau chaude des deux plantes médicinales

étudiées. Cet effet anti-inflammatoire *in vitro* exercé par les extraits de polysaccharides a été confirmé *in vivo* : la présente étude montre que l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris, un modèle d'inflammation aiguë, a été inhibé de manière dose-dépendante par les extraits. L'œdème de l'oreille induit par le xylène est un modèle expérimental reproductible et concède une bonne valeur prédictive pour le criblage des agents anti-inflammatoires (Lu *et al.*, 2006). L'application du xylène sur l'oreille induit une accumulation de liquide conduisant à la formation d'un œdème qui est caractéristique de l'inflammation aiguë (Okoli *et al.*, 2007). De plus, les extraits aqueux et éthanoliques de *Zygothymus gaetulum* inhibent significativement l'œdème induit par la carragénine, un autre modèle d'inflammation aiguë, chez les rats albinos (Rimbau *et al.*, 1999; Ait El Cadi *et al.*, 2012), cela est peut être dû à leur richesse en polysaccharides.

Les résultats obtenus jusqu'à présent nous ont amenés à effectuer une étude dose-effet des extraits de polysaccharide des deux plantes sur la production des FRO par les neutrophiles, les principales cellules productrices des FRO (El-Benna *et al.*, 2009), et à déterminer leur niveau d'action. Les deux extraits inhibent de manière dose dépendante la production des FRO dans les cellules au repos et en réponse à fMLF et PMA, un agoniste des PKC (Chanock *et al.*, 1992, El-Benna *et al.*, 2005; Belambri, 2014). Les résultats obtenus soutiennent les propriétés antioxydantes attribuées aux extraits de polysaccharides, et il peut être noté que les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* ont montré un effet inhibiteur plus efficace que les polysaccharides extraits de *Zygothymus gaetulum*, que ce soit dans les tests effectués *in vitro* ou ceux effectués *in vivo*. Il a été remarqué que l'effet inhibiteur dose-dépendant des extraits de polysaccharides sur la production des FRO par les neutrophiles humains stimulés par le fMLF est similaire à celui induit par le PMA, ce qui suggère une activité de scavenger des FRO, comme il a été observé avec des extraits de polysaccharides de certaines plantes médicinales (sakagami, 1992, Xie *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009). Notre inhibition des FRO observée ne peut être attribuée à un effet cytotoxique vis-à-vis des neutrophiles, les concentrations utilisées de polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et *Zygothymus gaetulum* dans notre étude ne sont pas toxiques pour ces phagocytes, comme illustré dans les résultats. La plupart des polysaccharides d'origine végétale sont relativement non toxiques et ne provoquent pas d'effets secondaires graves (Finlay et Hancock, 2004). Ainsi, d'autres études ont été effectuées afin de comprendre le mode d'action des extraits de polysaccharides ; en premier lieu, nous avons exploré s'ils étaient capables de capter l'H₂O₂

ou l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) produit par la xanthine oxydase (Xie *et al.*, 2008). Résultat intéressant : nous avons trouvé que les extraits de polysaccharides peuvent piéger l' H_2O_2 et non l' $O_2^{\cdot-}$. Ceci est en contraste avec les résultats obtenus par Gang Xie 2008 phytochemistry, qui ont montré que les polysaccharides extraits d'*Artemisa tripartite* ont un effet scavenger sur les deux formes réactives de l'oxygène, l' H_2O_2 et l' $O_2^{\cdot-}$. La propriété scavenger puissante des polysaccharides exogènes représente un potentiel thérapeutique pour les maladies inflammatoires associées au stress oxydatif. Il a été récemment mis en évidence *in vivo* que l'effet scavenger endogène de lectine telle que Reg3 alpha supprime les espèces réactives de l'oxygène extracellulaire pour protéger contre la toxicité du foie (Moniaux *et al.*, 2015).

Comme les deux extraits de polysaccharides étudiés n'ont pas d'effet scavenger sur $O_2^{\cdot-}$, nous avons exploré s'ils peuvent moduler la production extracellulaire de l'anion superoxyde par la NADPH oxydase (NOX2) dans les neutrophiles humains stimuli, spécifiquement mesuré par le test de réduction du cytochrome C. Il a été montré que certains extraits de polysaccharides peuvent moduler la production des FRO par les phagocytes en impliquant ou non une activité scavenger (Morimoto *et al.*, 2001, Nikolova 2013). En effet, les résultats obtenus dans la présente étude montrent que la production d' $O_2^{\cdot-}$ en réponse à fMLF ou PMA est inhibée par les deux extraits. *Anvillea garcinii* est plus efficace que *Zygothymum gaetulum*, de manière dose dépendante, à inhiber la réponse induite par le PMA comparée à la celle induite par le fMLF. Cette inhibition sélective suggère que : 1) les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* n'ont pas d'effet scavenger de l'anion superoxyde et 2) que les polysaccharides bioactifs présents dans *Anvillea garcinii* n'ont pas un effet inhibiteur direct sur la NOX2. Le PMA représente un outil approprié pour explorer les voies de transduction du signal impliqué dans l'activation de la NOX2 et dans le processus de dégranulation de neutrophiles (karlsson et Dahlgren, 2002; Heyworth et Badwey, 1990). Le PMA active directement la protéine Kinase C phospholipide-dépendante, qui migre vers la membrane plasmique et par la phosphorylation des composantes de la NADPH oxydase, comme la $p47^{phox}$ (phox pour phagocyte oxydase), participe dans l'assemblage et donc l'activation de la NOX2 (Raad *et al.*, 2009; Bertram et Ley 2011; El Benna *et al.*, 1994; Faust *et al.*, 1995; Nisimoto *et al.*, 1999 ; Dang *et al.*, 2001a; El Benna *et al.*, 2009). La $p47^{phox}$ est l'unité responsable du transport et d'organisation du trimère cytosolique $p47$ - $p67$ - $p40$ phox avec le cytochrome b558 pour former l'oxydase active. Fontayne *et al.* (2002) a montré en système acellulaire que différentes isoformes de la PKC phosphorylent directement la $p47^{phox}$

recombinante sur les sites PKC majeurs à savoir la sérine 303, 304, 315, 320, 328, 359, 370 et 379 et que tous les isoformes de la PKC présents dans les neutrophiles humain, y compris la PKC β , sont capables d'activer la NADPH oxydase. La mise en évidence de la voie PKC est soutenue par l'utilisation de la zymosan opsonisée, composants de la paroi cellulaire de la levure, qui active de manière PKC dépendante, la NOX2 des neutrophiles (sergeant et Phail, 1997). Les neutrophiles humains expriment cinq isoformes de PKC, α , β I, β II, δ et ζ (Majumdar *et al.*, 1991; Smallwood *et al.*, 1992; Dang *et al.*, 1994; Kent *et al.*, 1996). Parmi ces isotopes, les PKC α , β II et δ sont capables de phosphoryler tous les sites majeurs sur la p47 PHOX , alors que la PKC ζ phosphoryle uniquement un groupe sélectif de sites, en particulier Ser303/304 (Dang *et al.*, 2001b; Fontayne *et al.*, 2002). En plus de leur capacité de phosphoryler la p47 PHOX , les PKC α , β II, δ et ζ induisent l'activation de la NADPH oxydase dans un système acellulaire (Fontayne *et al.*, 2002). Ainsi, il nous semblait intéressant d'étudier l'effet de nos polysaccharides sur la translocation de p47 phox et de PKC des neutrophiles.

Nos résultats suggèrent que *Anvillea garcinii* inhibe la translocation de la p47 phox et de la PKC β vers la membrane plasmique des neutrophiles induite par le PMA tandis que *Zygothymium gaetulum* est inefficace. Cela pourrait expliquer la différence entre *Zygothymium gaetulum* et *Anvillea garcinii* sur la production de l'anion superoxyde par NOX2 dans les neutrophiles humains. L'activité de NOX2 est accompagnée d'une phosphorylation extensive de la p47 phox par le PKC (Fontayne *et al.*, 2002). Pour valider si l'extrait d'*Anvillea garcinii* implique la voie des PKC, nous avons étudié leur effet sur la sérine 328 de la p47 phox , qui est l'un des résidus sérine la plus phosphorylée par PKC (Fontayne *et al.*, 2002). Cette phosphorylation est particulièrement importante pour l'activité de l'oxydase (Ago *et al.*, 1999; Ago *et al.*, 2003). Les résultats obtenus en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre ce résidu phosphorylé montrent que les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* sont capables d'inhiber la phosphorylation de la p47 phox sur la serine 328 ainsi que sa translocation vers la membrane plasmique des neutrophiles et que les polysaccharides extraits de *Zygothymium gaetulum* sont inefficaces.

La p38MAPK et les ERK1/2 jouent un rôle dans l'activation de la NADPH oxydase des neutrophiles. Les données de la littérature montrent que ces kinases sont impliquées dans le priming de l'explosion oxydative (McLeish *et al.*, 1998) mais aussi dans l'activation de la NADPH oxydase (El Benna *et al.*, 1996; Krump *et al.*, 1997) et la production des FRO. En

effet, SB 203580 et PD98059, deux inhibiteurs spécifiques des p38 MAPK et MEK respectivement, inhibent la production d'anions superoxydes par les neutrophiles humains en réponse au fMLF et au PMA (Torres *et al.*, 1993; GS Worthen *et al.*, 1994 ; El Benna *et al.*, 1996; Nick *et al.*, 1997). L'équipe d'accueil a montré que ERK1/2 joue un rôle prédominant dans la phosphorylation de la p47^{PHOX} lorsque les PMN sont activés par du fMLF (Dewas *et al.*, 2000) et que ERK1/2 et p38 sont aussi impliquées dans la phosphorylation de la p67^{PHOX} (Dang *et al.*, 2003). Nous avons montré dans le présent travail que les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* inhibent la phosphorylation de ces deux MAPK kinases en réponse au PMA et *Zygothymus gaetulum* est inefficace. En résumé, les résultats indiquent une nette différence entre les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et ceux extraits de *Zygothymus gaetulum* sur la modulation de l'anion superoxyde induite par le PMA.

Par contraste aux résultats obtenus ci-dessus, l'inhibition de la production de l'anion superoxyde par les neutrophiles stimulés par le fMLF observée avec les extraits des deux plantes étudiées sont similaires et moins efficaces, ce qui suggère l'implication d'un mécanisme autre que la phosphorylation de la p47^{phox}. Il a été récemment montré que les polysaccharides solubles dans l'eau extraits de *Bupleurum chinense* inhibent le recrutement de HL60 induit par le fMLF en impliquant l'activation de rac-1 (Tong *et al.*, 2013). La migration de Rac1 ou Rac2 cytosolique vers la membrane plasmique dans l'assemblage de la NADPH oxydase fonctionnelle est cruciale et peut représenter un site d'action inhibiteur pour les extraits de polysaccharides. Rac2 migre indépendamment des autres composantes cytosoliques et est capable d'activer *in vitro* la NADPH oxydase, même en l'absence de la p47^{PHOX} (Gorzalczany *et al.*, 2000).

En plus de son rôle potentiel dans l'activation de la NADPH oxydase, Rac2 a un rôle crucial et sélectif dans la dégranulation des neutrophiles, un processus indépendant de la production des FRO (Abdel-Latif *et al.*, 2004). Ainsi, il est suggéré que les extraits de polysaccharides peuvent influencer le trafic de différents granules de neutrophiles et leur dégranulation dans le phagosome ou dans le milieu extracellulaire. La dégranulation des neutrophiles peut être initiée par le fMLF ou le PMA. Ainsi, nous avons initié ce processus et étudié l'effet des polysaccharides sur les granules azurophiles et spécifiques en estimant l'expression de la MPO et de CD11b respectivement. Nos résultats montrent que les extraits

Zygophyllum gaetulum et *Anvillea garcinii* ont été efficaces à inhiber la libération de la MPO induite par le fMLF dans le milieu extracellulaire. En plus de la MPO, les granules azurophiles contiennent trois sérine-protéases microbicides ; la protéinase-3, la cathepsine G et l'élastase. Ils sont ainsi considérés comme le réel compartiment microbicide mobilisé lors de la phagocytose (Kantari *et al.*, 2008). Malgré la fonction antimicrobienne de ces molécules, leur libération dans l'espace extracellulaire prolonge la réponse inflammatoire aigüe conduisant au développement de divers désordres inflammatoires (Kobayashi *et al.*, 2005). Par exemple, la MPO libérée par les neutrophiles est impliquée dans l'athérogénèse ainsi que dans l'initiation et la propagation des maladies cardiovasculaires (Nussbaum *et al.*, 2012). Les sérines protéases du neutrophile contribuent aux endommagements tissulaires et à la pathogénèse d'un nombre de pathologies respiratoires comme le syndrome de détresse respiratoire aigüe, l'emphysème pulmonaire et la fibrose kystique (Hirsch *et al.*, 2004). Par sa capacité d'inhiber l'exocytose des granules azurophiles du neutrophile, les extraits de polysaccharides pourraient exercer une fonction anti-inflammatoire en prévenant/réduisant les endommagements tissulaires dans le foyer inflammatoire. Contrairement aux résultats obtenus avec le fMLF, seule *Anvillea garcinii*, à la plus forte concentration utilisée, est capable d'inhiber la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par le PMA. Contrairement à nos extraits de polysaccharides, il a été montré que l'extrait aqueux anti-inflammatoire de *Punia granatum* inhibe sélectivement l'activité MPO de neutrophiles humains sans avoir un effet scavenger sur les FRO ou affectant leur production (Bachoual *et al.*, 2011). De plus, Xie *et al.*, (2007) ont montré que les polysaccharides extraits de *Tanacetum vulgare* stimulent les fonctions des neutrophiles par une forte augmentation de la libération de la MPO. D'autre part, nous avons observé que l'augmentation de l'expression du CD11b dans la membrane plasmique des neutrophiles humains en réponse au fMLF est inhibée par les extraits des deux plantes, *Zygophyllum gaetulum* et *Anvillea garcinii*.

En effet, l'inhibition de l'exocytose des granules spécifiques par les extraits suggère une réduction dans l'expression à la surface cellulaire des différentes molécules d'adhésions (CD11b/CD18, CD66 et CD67), ce qui pourrait limiter la migration excessive des neutrophiles au foyer inflammatoire. Les processus de dégranulation induite par les deux agonistes le PMA et le fMLP impliquent un grand nombre de molécules de signalisation intracellulaire ((Uriarte *et al.*, 2011; El Benna *et al.*, 2016). Le calcium cytosolique joue un

rôle crucial dans l'explosion oxydative et la dégranulation des neutrophiles (Sengelov *et al.*, 1993). L'élévation des concentrations cytosoliques du Ca²⁺ est induite par divers stimuli incluant l'engagement des CD11b/CD18 et du récepteur fMLF (Ng-Sikorski *et al.*, 1991; Sengelov *et al.*, 1993 ; Laudanna *et al.*, 1994). Le PMA n'affecte pas les niveaux du Ca²⁺ intracellulaire même à des concentrations élevées (Pontremoli *et al.*, 1986). Nous avons étudié si les polysaccharides ont un effet sur la mobilisation du Ca²⁺; les extraits de polysaccharides n'inhibent pas l'augmentation du calcium intracellulaire induite par le fMLF. Les mécanismes d'action anti-inflammatoire de nos polysaccharides seraient indépendants du changement intracellulaire de calcium des neutrophiles.

L'effet anti-inflammatoire observé des polysaccharides explique en partie leur utilisation dans la médecine traditionnelle et fait d'eux une alternative intéressante des thérapies anti-inflammatoires actuelles.

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 endémiques au Sahara du nord africain, *Zygophyllum gaetulum* et *d'Anvillea garcinii*, utilisées en médecine traditionnelle pour traiter ou soulager plusieurs types de maladies. 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.

Nous pouvons donc conclure à partir des résultats obtenus dans cette étude que les polysaccharides extraits de *Zygophyllum gaetulum* et *d'Anvillea garcinii* ont un effet antioxydant puissant sur le sang humain total et les phagocytes humains isolés, ce qui pourrait expliquer leur effet bénéfique sur le modèle d'inflammation aiguë étudié in vivo. En plus, *Anvillea garcinii* est très efficace à inhiber la phosphorylation de la p47^{phox} et sa translocation vers la membrane au cours du processus d'activation du complexe NADPH oxidase et la production de l'anion superoxyde. En plus de ces effets, les extraits peuvent inhiber la dégranulation des neutrophiles humains de la MPO hyper toxique et CD11B. Ces effets de polysaccharides sur les fonctions des neutrophiles sont indépendants de la mobilisation de calcium. Au final, on peut déduire que par l'inhibition des deux processus, la production des FRO par les phagocytes et la dégranulation, les polysaccharides étudiés dans le présent travail contribuent à protéger contre les maladies inflammatoires, et cela peut être associé à leur utilisation en médecine traditionnelle.

Notre travail a apporté de nouvelles données concernant les propriétés anti-inflammatoires des polysaccharides extraits de *Zygophyllum gaetulum* et *d'Anvillea garcinii* et a élucidé une partie de leurs mécanismes d'action. Les principales perspectives de recherche qui apparaissent à l'issue de cette thèse se résument dans les points suivants :

- 1- Etudier l'effet des extraits de polysaccharides sur d'autres fonctions du neutrophile et principalement le chimiotactisme.
- 2- Etudier leur effet sur d'autres voies de signalisation.
- 3- Ces fractions de polysaccharides isolées à partir de *Zygophyllum gaetulum* et *d'Anvillea garcinii* peuvent être un mélange complexe de différents types de

polysaccharides. D'autres études sont nécessaires pour purifier leurs différentes composantes, identifier leur structure fine et déterminer la relation structure-fonction.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2012). Cellular and Molecular Immunology. 7th edn. Elsevier/Saunders. Philadelphia. p 513.
- Abdel Sattar E., Galal A.M., Mossa G.S. (1996). Antitumor germacranolides from *Anvillea garcinii*. *J Nat Prod.* 59(4):403-5.
- 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: 832-9.
- Ago T., Kuribayashi F., Hiroaki H., Takeya R., Ito T., Kohda D., Sumimoto H. (2003). Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides., leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci.* 100(8): 4474-4485.
- Ago T., Kuroda J., Kamouchi M., Sadoshima J., Kitazono T. (2011). Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System: Review and perspective. *Circ J.* 75(8): 1791-1800.
- Ago T., Nunoi H., Ito T., Sumimoto H. (1999). Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem.* 274(47): 33644-33653.
- Agwu D.E., McPhail L.C., Chabot M.C., Daniel L.W., Wykle R.L., McCall C.E. (1989). Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry.* 264(3): 1405-1413.
- Ait El Cadi M., Khabbal Y., Alaoui K., Faouzi M.A., Bruno E., Mahraoui L., Y. (2008). Cherrah., Activite antidiarrheique de *Zygophyllum gaetulum.*, *Phytotherapie.* 6: 2-4.
- Ait El Cadi M., Makram S., Ansar M., Khabbal Y., Alaoui K., Faouzi M.A., Cherrah Y., Taoufik J. (2012). Anti-inflammatory activity of aqueous and ethanolic extracts of *Zygophyllum gaetulum*. *Ann Pharm Fr.* 70(2): 113-6.
- 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.
- Aquino R., Tortora S., Fkih-Tetouani S., Capasso A. (2001). Saponins from the roots of *Zygophyllum gaetulum* and their effects on electrically-stimulated guinea-pig ileum. *Phytochemistry.* 56(4):393-8.

- Ariel A., Fredman G., Sun Y.P., Kantarci A., Van Dyke T.E., Luster A.D., Serhan C.N. (2006). Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nature immunology*. 7(11): 1209-1216.
- Arnljots K., Sorensen O., Lollike K., Borregaard N. (1998). Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia*. 12: 1789–1795.
- ATHUKORALA Y., JUNG W.K., VASANTHAN T., JEON Y.J. (2006). An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*. 66:184-191.
- AUSTARHEIM I., MAHAMANE H., SANOGO R., TOGOLA A., DABADI M. K., VESTRHEIM A.C., INNJERDINGEN K.T., MICHAELSEN T., DIALLO D., PAULSEN B.S. (2012). Anti-ulcer polysaccharides from *Cola cordifolia* bark and leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 143: 221–227.
- Babior B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5), 1464-1476.
- Babior B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*. 109(1): 33-44.
- Babior B.M. (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 16: 42-47.
- Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 397(2): 342-344.
- 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 Chem Toxicol*. 49(6): 1224-8.
- Baggiolini M., Clark-Lewis I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS letters*. 307(1): 97-101.
- Ballance S., Børsheim K.Y., Inngjerdingen K., Paulsen B.S., Christensen B.E. (2007). Partial characterisation and reexamination of polysaccharides released by mild acid hydrolysis from the chlorite-treated leaves of *Sphagnum papillosum*. *Carbohydr. Polym.* 67(1):104-115.
- Bazzoni F., Tamassia N., Rossato M., Cassatella M.A. (2010). Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *European journal of immunology*. 40(9): 2360-2368.
- Beauvillain C., Delneste Y., Scotet M., Peres A., Gascan H., Guermonprez P., Barnaba V., Jeannin P. (2007). Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood*. 110(8): 2965-2973.

- Belambri S.A. (2014) Etude du mécanisme d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire : Analyse de la dynamique de phosphorylation de la p47^{phox} dans le neutrophile activé. Thèse de Doctorat en Biochimie., Université Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif, Algérie. 132p.
- Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle., Médecine arabe ancienne et savoirs populaires., Ed. Ibis Press., Paris.
- Bellocchio S., Moretti S., Perruccio K., Fallarino F., Bozza S., Montagnoli C., Mosci P., Lipford G.B., Pitzurra L., Romani L. (2004). TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J. Immunol.* 173(12): 7406-7415.
- Bendjeddou D., Lalaoui K., Satta D. (2003). Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*., *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. *J Ethnopharmacol.* 88: 155-60.
- 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. *J. Immunol.* 171(11): 6052-6058.
- Berton G., Fumagalli L., Laudanna C., Sorio C. (1994). Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils. *The Journal of cell biology.* 126(4): 1111-1121.
- Berton G., Lowell C.A. (1999). Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cellular signalling.* 11(9): 621-635.
- Bertram A., Ley K. (2011). Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Arch Immunol Ther Exp Warsz.* 59(2): 79-87.
- Bokoch G.M., Zhao T. (2006). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxidants & redox signaling.* 8(9-10): 1533-1548.
- Borregaard N. (2010). Neutrophils., from marrow to microbes. *Immunity.* 33: 657-670.
- Borregaard N. and Cowland J.B. (1997). Granules of neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 89: 3503-3521.
- Borregaard N., Sorensen., Theilgaard-Mönch (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunol.* 28(8): 340-345.
- Botting R.M., Botting J.H. (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clinical Drug Investigation.* 19: 1-7.
- Bourke E., Cassetti A., Villa A., Fadlon E., Colotta F., Mantovani A. (2003). IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils. *J Immunol.* 170(12): 5999-6005.

-
- Bradford P.G., Rubin R.P. (1986). Quantitative changes in inositol 1,4,5-trisphosphate in chemoattractant-stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. 261(33): 15644-15647.
- Bréchar d S., Plançon S., Tschirhart E.J. (2013). New insight into the regulation of neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: A focus on the role of lipid and Ca²⁺ signaling. *Antioxidant and Redox Signaling*. 18(6): 661-676.
- Brinkmann V., Zychlinsky A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews. Microbiology*. 5(8): 577-582.
- Bystrom J., Evans I., Newson J., Stables M., Toor I., van Rooijen N., Crawford M., Colville-Nash P., Farrow S., Gilroy D.W. (2008). Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*. 112(10): 4117-4127.
- Campanelli D., Melchior M., Fu Y., Nakata M., Shuman ., Nathan C., Gabay J.E. (1990). Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease., antibiotic., and autoantigen from human neutrophils. *J Exp Med*. 172: 1709–1715.
- Carter R.A., Wicks I.P. (2001). Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis Rheum*. 44(5): 985-94.
- Caruso R.A., Fedele F., Finocchiaro G., Venuti A.A. (2012). Neutrophil-tumor cell phagocytosis (Cannibalism) in human tumors: an update and literature review. *Exp Oncol*. 34(3): 303-311.
- Cassatella M.A. (2010). Neutrophils II. In: "Serhan C.N., Ward P.A., Gilroy D.W (ed). *Fundamentals of Inflammation*". New York: Cambridge University Press. Pp: 49-64.
- Catelan S.C., Belentani R.M., Marques L.C., Silva E.R., Silva M.A., Caparroz-Assef S.M., Cuman R. K. N., Bersani-Amado C. A. (2006). The role of adrenal corticosteroids in the anti inflammatory effect of the whole extract of *Harpagophytum procumbens* in rats *Phytomedicine*. 13: 446-451.
- Chapman M.L., Rubin B.R., Gracy R.W. (1989). Increased carbonyl content of proteins in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 16(1): 15-18.
- Chedid P., Hurtado-Nedelec M., Marion-Gaber B., Bournier O., Hayem G., Gougerot-Pocidalo M.A., Frystyk J., Flyvbjerg A., El Benna J., Marie J.C. (2012). Adiponectin and its globular fragment differentially modulate the oxidative burst of primary human phagocytes. *Am J Pathol*. 180: 682-92.
- Chen H.L., Li D.F., Chang B.Y., Gong L.M., Dai J.G., Yi G.F. (2003). Effects of Chinese herbal polysaccharides on the immunity and growth performance of young broilers. *Poult Sci*. 82: 364–70.

- Chessa T.A., Anderson K.E., Hu Y., Xu Q., Rausch O., Stephens L.R., Hawkins P.T. (2010). Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood*. 116(26): 6027-6036.
- Chessa TAM., Anderson K.E., Hu Y., XU Q., Rausch O., Stephens L.R (2010). Phosphorylation of threonine 154 in p40phox is an important physiological signal for activation of the neutrophil NADPH oxidase. *Blood*. 116: 6027-6036.
- Chou W.H., Choi D.S., Zhang H., Mu D., McMahon T., Kharazia V.N., Lowell C.A., Ferriero D.M., Messing R.O. (2004). Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*. 114(1): 49-56.
- Christenson K., Bjorkman L., Karlsson J., Sundqvist M., Movitz C., Speert D.P., Dahlgren C., Bylund J. (2011). In vivo-transmigrated human neutrophils are resistant to antiapoptotic stimulation. *Journal of leukocyte biology*. 90(6): 1055-1063.
- Courtois J. (2009). Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Curr Opin Microbiol*. 12(3): 261-73.
- Dang P.M., Cross A.R., Babior B.M. (2001a). Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67^{phox} and cytochrome b558. *Proc. Natl Acad Sci*. 98: 3001–3005.
- Dang P.M., Fontayne A., Hakim J., El Benna J., Perianin A. (2001b). Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47^{phox} and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol*. 166(2): 1206-1213.
- Dang P.M., Hakim J., Perianin A. (1994). Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils. *FEBS letters*. 349(3): 338-342.
- Dang P.M., Morel F., Gougerot-Pocidallo M.A., El Benna J. (2003). Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67^{PHOX} by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry*. 42(15): 4520-4526.
- Dang P.M., Stensballe A., Boussetta T., Raad H., Dewas C., Kroviarski Y., Hayem G., Jensen O.N., Gougerot-Pocidallo M.A., El-Benna J. (2006). A specific p47^{phox} -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation*. 116(7): 2033-2043.
- Delaporte R.H., Sarragiotto M.H., Takemura O.S., Sánchez G.M., Filho B.P., Nakamura C.V. (2004). Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsiastreptocarpa* Baker-Bromeliaceae. *J Ethnopharmacol*. 95: 229-33.

-
- Detmers P.A., Zhou D., Powell D., Lichenstein H., Kelley., Pironkova R. (1995). Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J. Immunol.* 155: 2085–2095.
- Dewas C., Fay M., Gougerot-Pocidallo M.A., El-Benna J. (2000). The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47^{phox} phosphorylation in human neutrophils. *J. Immunol.* 165(9): 5238-5244.
- Diacovo T.G., Roth S.J., Buccola J.M., Bainton D.F., Springer T.A. (1996). Neutrophil rolling., arrest., and transmigration across activated., surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood.* 88(1): 146-157.
- DIALLO D., SANOGO R., YASAMBOU H., TRAORE A., COULIBALY K., MAIGA A., (2004). Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae)., utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie.* 7: 1073–1080.
- Dong., H., Xiang Q., Gu Y., Wang Z., Paterson N.G., Stansfeld P.J., He C., Zhang Y., Wang W., Dong C. (2014). Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature* 511: 52–56.
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews.* 82(1): 47-95.
- Duwiejua M., Zeitlin I. J. (1993). Plants as source of anti-inflammatory substances. In : *Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals.* Harvey A L. Eds, Taylor & Francis (Royaume-Uni). Pp: 153.
- El Benna J., Dang P.M.C., Gougerot-Pocidallo M.A. (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of the p47^{phox} phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol.* 30: 279-289.
- El Benna J., Dang P.M.C., Gougerot-Pocidallo M.A., Elbim C. (2005). Phagocyte NAPH oxidase a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp.* 53: 199-206.
- El Benna J., Dang P.M.C., Gougerot-Pocidallo M.A., Marie J.C., Braut-Boucher F. (2009). P47^{phox}. , the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: Structure., phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med.* 41: 217-225.
- El Benna J., Dang P.M.C., Périanin A. (2010). Peptide-based inhibitors of phagocyte NADPH oxidase. *Biochem Pharmacol.* 80: 778-785.
- El Benna J., Faust L.P., Babior B.M. (1994). The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47^{phox} during neutrophil activation. Phosphorylation of sites

-
- recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J. Biol Chem.* 269(38): 23431-23436.
- El Benna J., Han J., Park J.W., Schmid E., Ulevitch R.J., Babior B.M. (1996). Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47^{phox} by p38 and ERK but not by JNK. *Archives of biochemistry and biophysics.* 334(2): 395-400.
- El Benna J., Hayem G., Dang P.M., Fay M., Chollet-Martin S., Elbim C., Meyer O., Gougerot-Pocidallo M.A. (2002). NADPH oxidase priming and p47^{phox} phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy. *Inflammation.* 26(6): 273-278.
- El Benna J., Ruedi J.M., Babior B.M. (1994). Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47^{phox} and p67^{phox} to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J. Biol Chem.* 269: 6729-34.
- El Hamsas El Youbi A., Bousta D., Ouahidi I., Aarab L. (2010). [Primary pharmacological screening of an endemic plant from the Southern Morocco (Tetraena gaetula [Emb. & Maire] Beier & Thulin)]. *C R Biol.* 333(10): 736-43.
- El-Benna J., Dang P.M., Perianin A. (2010). Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochemical pharmacology.* 80(6): 778-785.
- El-Benna J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Marie J.C., Gougerot-Pocidallo M.A., Dang P.M (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev.* 273(1): 180-93.
- Esaguy N., Aguas A.P., Vilanova M., Silva M.T. (1991). Activation of human neutrophils by phorbol ester decreases the cytoplasm compactness and the lactoferrin content of the granulocytes. *Journal of leukocyte biology.* 50(5): 444-452.
- Ethuin F., Gerard B., Benna J.E., Boutten A., Gougereot-Pocidallo M.A., Jacob L., Chollet-Martin S. (2004). Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 84(10): 1363-1371.
- Fallman M., Gullberg M., Hellberg C., Andersson T. (1992). Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *The Journal of biological chemistry.* 267(4): 2656-2663.
- Faurschou M., Borregaard N. (2003). Neutrophil granuls and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection.* 5(14): 1317-1327.

- Faust L.R., el Benna J., Babior B.M., Chanock S.J. (1995). The phosphorylation targets of p47^{phox}, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J. Clin Invest.* 96(3): 1499-1505.
- Filardy A.A., Pires D.R., Nunes M.P., Takiya C.M., Freire-de-Lima C.G., Ribeiro-Gomes FL., DosReis G.A. (2010). Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low) IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J. Immunol.* 185(4): 2044-2050.
- Fontayne A., Dang P.M., Gougerot-Pocidallo M.A., El-Benna J. (2002). Phosphorylation of p47^{phox} sites by PKC alpha., beta II., delta., and zeta: effect on binding to p22^{phox} and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry.* 41(24): 7743-7750.
- Forbes L., Truong O., Wientjes F.B., Moss S.J., Segal A.W. (1999). The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67^{phox} is Thr233. *Biochem J.* 338: 99-105.
- 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.
- Friedl A., Stoesz S.P., Buckley P., Gould M.N. (1999). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J.* 31: 433-441.
- Fuchs A., Bouin A.P., Rabilloud T., Vignais P.V. (1997). The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. *Eur J Biochem.* 249(2): 531-540.
- Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology.* 176(2): 231-241.
- Fuortes M., Jin W.W., Nathan C. (1993). Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology.* 120(3): 777-784.
- Galli S.J., Borregaard N., Wynn T.A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 12(11): 1035-1044.
- Gang Xie., Igor A., Schepetkin., Daniel W., Siemsen., Liliya N., Kirpotina., James A., Wiley., Mark T. (2008). Fractionation and Characterization of Biologically-active Polysaccharides from *Artemisia tripartite*. *Phytochemistry.* 69(6): 1359-1371.
- GOLOVCHENKO V. V., KHARMOVA D.S., OVODOVA R. G., SHASHKOV A. S., OVODOV Y. S. (2012). Structure of pectic polysaccharides isolated from onion *Allium*

- cepa L. using a simulated gastric medium and their effect on intestinal absorption. *Food Chemistry*. 134: 1813–1822.
- Gorshkova T.A., Kozlova L.V., Mikshina P.V. (2013). Spatial structure of plant cell wall polysaccharides and its functional significance. *Biochemistry (Mosc)*. 78(7): 836-53.
- Gorzalczany Y., Sigal N., Itan M., Lotan O., Pick E. (2000). Targeting of Rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *The Journal of biological chemistry*. 275(51): 40073-40081.
- Gougerot-Pocidallo M.A. (2012). The neutrophil and systemic inflammation. *Joint., bone., spine: revue du rhumatisme*. 79(3): 209-211.
- Gougerot-Pocidallo M.A., Elbim C., Dang P.M., El Benna J. (2006). [Primary immune deficiencies in neutrophil functioning]. *Presse Med*. 35(5 Pt 2): 871-8.
- Granert C., Raud J., Xie. X., Lindquist L., Lindbom L. (1994). Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. *Journal of Clinical Investigation*. 93: 929–936.
- Groemping Y., Lapouge K., Smerdon S.J., Rittinger K. (2003). Molecular basis of phosphorylation-induced activation of NADPH oxidase. *Cell*. 113: 343-355.
- Groemping Y., Rittinger K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal*. 386(Pt 3): 401-416.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*. 260(6): 3440-3450.
- Gullberg U., Bengtsson N., Bülow E., Garwicz D., Lindmark A., Olsson I. (1999). Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *J. Immunol Methods*. 232: 201-210.
- Häger m., Cowland J.B., Borregaard N. (2010). Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*. 268: 25-34.
- Haibin Tonga., Dan Tiana., Zhongmei Heb., Yang Liua., Xiaodan Chua., Xin Suna (2013). Polysaccharides from *Bupleurum chinense* impact the recruitment and migration of neutrophils by blocking fMLP chemoattractant receptor-mediated functions. *Carbohydrate Polymers* 92: 1071– 1077.
- Hammiche V., Maiza K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol*. 105: 358-67.
- Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants., myeloperoxidase., and bacterial killing. *Blood*. 92(9): 3007-3017.

- Hayashi F., Means T.K., Luster A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 102(7): 2660-2669.
- Hellberg C., Molony L., Zheng L., Andersson T. (1996). Ca²⁺ signalling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P₃. *The Biochemical journal*. 317(Pt 2): 403-409.
- Heyworth P.G., Badwey J.A. (1990). Continuous phosphorylation of both the 47 and the 49 kDa proteins occurs during superoxide production by neutrophils. *Biochim Biophys Acta*. 1052: 299-305.
- 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.
- Hosseinzadeh H., Ramezani M., Fadishei M., Mahmoudi M. (2002). Antinociceptive., anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zhumeria majdae* extracts in mice and rats. *Phytomedicine*. 9: 135-41.
- Huang X., Li Q., Li H., Guo L. (2009). Neuroprotective and antioxidative effect of cactus polysaccharides in vivo and in vitro. *Cell Mol Neurobiol*. 29(8):1211-21.
- Inngjerdigen K.T., Coulibaly A., Diallo D., Michaelsen T.E., Paulsen B.S. (2006). A complement fixing polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch., a medicinal plant from Mali., West Africa. *Biomacromolecules*. 7:48-53.
- Jaouhari J.T., Lazrek H.B., Seddik A., Jana M. (1999). Hypoglycaemic response to *Zygophyllum gaetulum* extracts in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Ethnopharm.* 64: 211-217.
- Jaouhari J.T., Lazrek H.B., Seddik A., Jana M. (2000). The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. *J. Ethnopharm.* 69 17-20.
- Jiang J.B., Qiu J.D., Yang L.H., He J.P., Smith G.W., Li H.Q (2010). Therapeutic effects of astragalus polysaccharides on inflammation and synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. *Int J Rheum Dis.* 13(4):396-405.
- Jiao R., Liu Y., Gao H., Xiao J., So K.F. (2016). The Anti-Oxidant and Antitumor Propertiesn of Plant Polysaccharides. *Am J Chin Med.* 44(3): 463-88.
- Joiner K.A., Ganz T., Albert J., Rotrosen D. (1989). The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific., but not azurophil., granule constituents into neutrophil phagosomes. *J Cell Biol.* 10: 2771-2782.

- Joseph M.M., Aravind S.R., George S.K., Varghese S., Sreelekha T.T. (2013). A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts in vitro and in vivo anticancer activity. *Carbohydr Polym.* 98(2): 1466-75.
- Kamen L.A., Schlessinger J., Lowell C.A. (2011). Pyk2 is required for neutrophil degranulation and host defense responses to bacterial infection. *J. Immunol.* 186(3): 1656-1665.
- 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. *J Biol Chem.* 276: 21960–21968.
- Kantari C., Pederzoli-Ribeil M., Witko-sarsat V. (2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Trends in Innate Immunity.* 15: 118-146.
- Kaplan M.J., Radic M. (2012). Neutrophil extracellular traps: Double-Edge Swords of innate immunity. *J. Immunol.* 189: 2689-2695.
- Karlsson A., Dahlgren C. (2002). Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid Redox Signal.* 4: 49-60.
- Kent J.D., Sergeant S., Burns D.J., McPhail L.C (1996). Identification and regulation of protein kinase C-delta in human neutrophils. *J. Immunol.* 157(10): 4641-4647.
- Khabbal Y., Ait-El-Cadi M., Alaoui K., Faouzi M.A., Cherrah Y. (2006). Activite anti-inflammatoire de *Zygophyllum gaetulum.*, *Phytotherapie* 5: 227–229.
- Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight JS., Friday S., Li S., Patel R.M., Subramanian V., Thompson P., Chen P., Fox D.A., Pennathur S., Kaplan M.J (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine.* 5(178): 178ra140.
- Kjeldsen L., Bainton D.F., Sengelov H., Borregaard N. (1993). Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood.* 82(10): 3183-3191.
- Klebanoff S.J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology.* 77(5): 598-625.
- 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.
- Kolaczowska E., Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology.* 13(3): 159-175.

- Kolaczowska E., Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology*. 13(3): 159-175.
- Kuhns D.B., Gallin J.I. (1995). Increased cell-associated IL-8 in human exudative and A23187-treated peripheral blood neutrophils. *J. Immunol*. 154(12): 6556-6562.
- Kurt-Jones E.A., Mandell L., Whitney C., Padgett A., Gosselin K., Newburger P.E., Finberg RW (2002). Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood*. 100(5): 1860-1868.
- Lacy P. (2005). The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacology & therapeutics*. 107(3): 358-376.
- Lacy P. (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2(3): 98-108.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.
- Lambeth J.D. (2007). Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free radical biology & medicine*. 43(3): 332-347.
- Larhsini M., Markouk M., Jaouhari J.T., Bekkouche K., Lazrek H.B., Jana M. (2002). The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants., *Phytother. Res*. 16: 97–98.
- Laudanna C., Constantin G., Baron P., Scarpini E., Scarlato G., Cabrini G., Dececchi C., Rossi F., Cassatella M.A., Berton G. (1994). Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *The Journal of biological chemistry*. 269(6): 4021-4026.
- Lemanske R.F Jr., Busse W.W. (1997). Asthma. *JAMA*. 278: 1855-73.
- Ley K., Smith E., Stark M.A. (2006). IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res*. 34: 229–242.
- Lin X., Shaw P.C., Sze S.C., Tong Y., Zhang Y. (2011). Dendrobium officinale polysaccharides ameliorate the abnormality of aquaporin5, pro-inflammatory cytokines and inhibit apoptosis in the experimental Sjogren's syndrome mice. *Int Immunopharmacol*. 11:2025–32.
- LIU J., WEN X.Y., ZHANG X. Q., PU H. M., KAN J., JIN C. H. (2015). Extraction, characterization and in vitro antioxidant activity of polysaccharides from black soybean. *Int. J. Biol. Macromol*. 72:1182–1190.

-
- LIU J.Y., HU J.H., ZHU Q.G., (2007). Effect of matrine on the expression of substance P receptor and inflammatory cytokines production in human skin keratinocytes and fibroblasts. *International Immunopharmacology*. 7: 816-823.
- Liu., C.J., Lin., J.Y. (2012). Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on lipopolysaccharide-stimulated macrophages through modulating pro-/anti-inflammatory cytokines secretion and Bcl-2/Bak protein ratio. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 3032–3039.
- Lollike K., Kjeldsen L., Sengelov H., Borregaard N. (1995). Lysozyme in human neutrophils and plasma. A parameter of myelopoietic activity. *Leukemia*. 9: 159–164.
- Lotz S., Aga E., Wilde I., van Zandbergen G., Hartung T., Solbach W., Laskay T (2004). Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *Journal of leukocyte biology*. 75(3): 467-477.
- Lu H.M., Liang Y.Z., Yi L.Z., Wu X.J. (2006). Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection. *Journal of Ethnopharmacology*. 104: 245–249.
- Madden K., Flowers L., Salani R., Horowitz I., Logan S., Kowalski K., Xie J., Mohammed S. I. (2009). Proteomics-based approach to elucidate the mechanism of antitumor effect of curcumin in cervical cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 80: 9-18.
- Majumdar S., Rossi M.W., Fujiki T., Phillips W.A., Disa S., Queen C.F., Johnston R.B Jr., Rosen O.M., Corkey B.E., Korchak H.M. (1991). Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. Differential substrate specificities of a translocatable calcium- and phospholipid-dependent beta-protein kinase C and a phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl coenzyme A. *The Journal of biological chemistry*. 266(14): 9285-9294.
- Makni-Maalej K., Chiandotto M., Hurtado-Nedelec M., Bedouhene S., Gougerot-Pocidallo M.A., Dang P.M., El-Benna J. (2012). Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47^{phox} and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases., PI3Kinase., PKC., ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol*. 85(1): 92-100.
- 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): 519-531.
- Marcoux J., Man P., Petit-Haertlein I., Vivès C., Forest E., Fieschi F. (2010). P47^{phox} molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *J. Biol Chem*. 285(37): 28980-28990.

- Markert M., Andrews P.C., Babior B.M. (1984). Measurement of O₂- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods in enzymology*. 105: 358-365.
- Marwah R.G., Fatope M.O., Al Mahrooqi R., Varma G.B., Al Abadi H., Al-Burtamani S. K. S. (1991). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Free radicals in health and disease. *Indian Journal of Clinical Practice*. 2: 15–26.
- Mathy M., Sanchez C., Priem F., Henrotin Y. (2007). La curcumine inhibe la synthèse d'interleukine-6., d'interleukine-8., de monoxyde d'azote et de prostaglandine E2 par les chondrocytes bovins. *Revue du Rhumatisme*. 74: 10-11.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*. 244(22): 6049-6055.
- McKimmie C.S., Fraser A.R., Hansell C., Gutierrez L., Philipsen S., Connell L., Rot A., Kurowska-Stolarska M., Carreno P., Pruenster M., Chu C.C., Lombardi G., Halsey C., McInnes I.B., Liew F.Y., Nibbs R.J., Graham G.J. (2008). Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1. *J. Immunol*. 181(5): 3353-3363.
- McLeish K.R., Knall C., Ward R.A., Gerwins P., Coxon P.Y., Klein J.B., Johnson G.L. (1998). Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *Journal of leukocyte biology*. 64(4): 537-545.
- Mebarki L., Kaid H.M., Benlarbi L., Rahmani A., Sarhani A. (2013). *Anvillea radiata* as a source of natural antifungal compounds. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 7(46): pp. 2947-2952.
- Middleton J., Neil S., Wintle J., Clark-Lewis I., Moore H., Lam C., Auer M., Hub E., Rot A. (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*. 91(3): 385-395.
- Moniaux N., Darnaud M., Garbin K., Dos Santos A., Guettier C., Samuel D., Amouyal G., Amouyal P., Bréchet C., Faivre J. (2015). The Reg3 α (HIP/PAP) Lectin Suppresses Extracellular Oxidative Stress in a Murine Model of Acute Liver Failure. *PLoS One*. 10: e0125584.
- Morimoto M., Saimoto H., Usui H., Okamoto Y., Minami S., Shigemasa Y. (2001). Biological activities of carbohydrate-branched chitosan derivatives. *Biomacromolecules*. 2(4): 1133-6.
- Muller W.A., Weigl S.A., Deng X., Phillips D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *The Journal of experimental medicine*. 178(2): 449-460.

- Nagaji J. (1999). The role of protein kinase C and $[Ca^{2+}]_i$ in superoxide anion synthesis and myeloperoxidase degranulation of human neutrophils. *The Kurume medical journal*. 46(3-4): 157-162.
- Nathan C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology*. 6(3): 173-182.
- Nauseef W.M. (2004). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and cell biology*. 122(4): 277-291.
- Nauseef W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews*. 219: 88-102.
- Nauseef W.M., Borregaard N. (2014). Neutrophils at work. *Nature immunology*. 15(7): 602-611.
- Nergard C.S., Diallo D., Michaelsen T.E., Malterud K.E., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H., Paulsen B.S. (2004). Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *J Ethnopharmacol*. 91:141-52.
- Ng-Sikorski J., Andersson R., Patarroyo M., Andersson T. (1991). Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Experimental cell research*. 195(2): 504-508.
- Nick J.A., Avdi N.J., Young S.K., Knall C., Gerwins P., Johnson G.L., Worthen G.S. (1997). Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *Journal of Clinical Investigation*. 99(5): 975-986.
- Nikolova M., Ambrozova G., Kratchanova M. (2013). Effects of pectic polysaccharides isolated from leek on the production of reactive oxygen and nitrogen species by phagocytes. *J. Med Food*. 16. 711-8.
- Okoli C.O., Akah P.A., Nwafor S.V., Anisiobi A.I., Ibegbunam I.N., Erojikwe O. (2007) Antiinflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 219-225.
- Ooi., V.E.C., Liu., F., (1999). A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int. J. Medic. Mush.* 1: 195-206.
- Ostergaard C., Yieng-Kow R.V., Benfield T., Frimodt-Møller N., Espersen F., Lundgren J.D. (2000). Inhibition of leukocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect Immun*. 68(6):3153-7.
- Ostergaard C., Yieng-Kow R.V., Benfield T., Frimodt-Møller N., Espersen F., Lundgren J.D. (2000). Inhibition of leukocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin

decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect Immun.* 68(6): 3153-7.

Ozenda P. (1991). *Flore et végétation du Sahara*. Ed. CNRS., Paris. Pp 662 .

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 of the United States of America.* 97(25): 13766-13771.

Painter T.J. (1991). Lindow man., tollund man and other peat-bog bodies: the preservative and antimicrobial action of Sphagnan., a reactive glycuronoglycan with tanning and sequestering properties. *Carbohydr. Polym.* 15(2): 123-142.

Paulsen H., Brockhausen I. (2001). From imino sugars to cancer glycoproteins. *Glycoconj J.* 18 (11-12):867-70.

Pontremoli S., Melloni E., Michetti M., Sacco O., Salamino F., Sparatore B., Horecker B.L. (1986). Biochemical responses in activated human neutrophils mediated by protein kinase C and a Ca²⁺-requiring proteinase. *The Journal of biological chemistry.* 261(18): 8309-8313.

Popa-Nita O., Proulx S., Pare G., Rollet-Labelle E., Naccache P.H. (2009). Crystal-induced neutrophil activation: XI. Implication and novel roles of classical protein kinase C. *J Immunol.* 183(3): 2104-2114.

Posocco B., Dreussi E., de Santa J., Toffoli G., Abrami M., Musiani F., Grassi M., Farra R., Tonon F., Grassi G. (2015). Polysaccharides for the delivery of antitumor drugs. *Materials.* 8: 2569–2615.

Quinn Finlay B.B., Hancock REW. (2004). Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 497–504.

Raad H., Pacllet M.H., Boussetta T., Kroviarski Y., Morel F., Quinn M.T., Gougerot-Pocidallo M.A., Dang P.M., 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., p67^{phox}., and p47^{phox}. *FASEB J.* 23(4): 1011-22.

Raad H., Pacllet MH., Boussetta T., Kroviarski Y., Morel F., Quinn MT., Gougerot-Pocidallo 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 journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 23(4): 1011-1022.

- Ravetch J.V., Kinet J.P. (1991). Fc receptors. *Annual review of immunology*. 9: 457-492.
- 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)., *Phytother. Res.* 13: 128–132.
- 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). *Phytother Res.* 13(2): 128-32.
- Roos D., de Boer M., Kuribayashi F., Meischl C., Weening R.S., Segal A.W., Ahlin A., Nemet K., Hossle JP., 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.
- Rosen H., Michel B.R. (1997). Redundant contribution of myeloperoxidase-dependent systems to neutrophil-mediated killing of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 65(10): 4173-4178.
- Rotelli A.E., Guardia T., Juárez A.O., de la Rocha N.E., Pelzer L.E. (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res.* 48: 601-6.
- Ruch W., Cooper P.H., Baggiolini M. (1983) Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. *J Immunol Methods*. 63(3): 347-57.
- Saad S.F., Saber A.H., Scott P.M. (1967). Pharmacological studies on zygo- phillin and quinovic acid., *Bull. Fac. Pharm., Cairo University* 6: 253–263.
- 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.
- Safir O., Fkih-Tetouani S., De Tommasi N., Aquino R. (1998). Saponins from *Zygophyllum gaetulum*. *J. Nat Prod.* 61(1): 130-4.
- Sakagami H., Kohno S., Takeda M., Nakamura K., Nomoto K., Ueno I., Kanegasaki S., Naoe T., Kawazoe Y. (1992). O₂- scavenging activity of lignins., tannins and PSK. *Anticancer Res.* 12: 1995-2000.
- Samuelsen A.B., Paulsen B.S., Wold J.K., Otsuka H., Yamada H. (1995). Isolation and partial characterization of biologically-active polysaccharides from *Plantago major* L. *Phytother Res.* 9: 211–18.
- 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.

Scartezzini P., Speroni E. (2000). Medicine with antioxidant activity Review on some plants of Indian traditional. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 23–43.

Schepetkin I.A., Quinn M.T. (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol*. 6(3): 317-33.

Scher J.U., Abramson S.B., Pillinger M.H. (2010). Neutrophils I. In: "Serhan CN., Ward PA., Gilroy DW (ed). *Fundamentals of Inflammation*". New York: Cambridge University Press. Pp: 39-48.

Schmeling D.J., Peterson P.K., Hammerschmidt D.E., Kim Y., Verhoef J., Wilkinson B.J., Quie P.G. (1979). Chemotaxigenesis by cell surface components of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*. 26(1): 57-63.

Schoroderet M. (1992). *Pharmacologie., des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Volume 2. Eds., Office des publications universitaires (Alger), Pp : 523-530.

Schramm R., Thorlacius H. (2004). Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. *Inflamm Res*. 53(12): 644-652.

Schwab J.M., Chiang N., Arita M., Serhan C.N. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 447(7146): 869-874.

Schwarzenberger P., Huang W., Ye P., Oliver P., Manuel M., Zhang Z., Bagby G., Nelson S., Kolls J.K. (2000). Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J. Immunol*. 164: 4783–4789.

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

Sengelov H., Boulay F., Kjeldsen F., Borregaard N. (1994). Subcellular localization and translocation of the receptor for *N*-formylmethionylleucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J*. 299 (2): 473–479.

Sengelov H., Follin P., Kjeldsen L., Lollike K., Dahlgren C., Borregaard N. (1995). Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol*. 154(8): 4157-4165.

Sengelov H., Kjeldsen L., Borregaard N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*. 150(4): 1535-1543.

Sereila O., Kelkka T., Pizzola A., Hultqvist M., Holmdahl R. (2011). NOX2 complex-driven ROS as immune regulators. *Antioxidant & Redox Signaling*. 15(8): 2197-2208.

- Sergeant S., McPhail L.C. (1997). Opsonized zymosan stimulates the redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils. *J. Immunol.* 159(6):2877-85.
- 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): 349-361.
- Serhan C.N., Yang R., Martinod K., Kasuga K., Pillai P.S., Porter T.F., Oh S.F., Spite M. (2009). Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *The Journal of experimental medicine.* 206(1): 15-23.
- Setty A.R., Sigal L.H. (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 34: 773-784.
- 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.
- Sinha S., Watorek W., Karr S., Giles J., Bode W., Travis J. (1987). Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 2228–2232.
- Smallwood J.I., Malawista S.E. (1992). Protein kinase C isoforms in human neutrophil cytoplasts. *Journal of leukocyte biology.* 51(1): 84-92.
- Smith R.J., Justen J.M., Sam L.M. (1988). Effects of a protein kinase C inhibitor., K-252a., on human polymorphonuclear neutrophil responsiveness. *Biochemical and biophysical research communications.* 152(3): 1497-1503.
- Song J.X., Shaw P.C., Wong N.S., Sze C.W., Yao X.S., Tang C.W., Zhang Y.B. (2012). Chrysotoxine., a novel bibenzyl compound selectively antagonizes MPP(?), but not rotenone., neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett.* 521: 76–81.
- SOUZA R.O.S., ASSEREUY A.M.S., MADEIRA J.C., CHAGAS F.D.S., PARREIRAS L. A., SANTOS G.R.C., MOURAO P.A.S., PEREIRA M.G. (2015). Purified polysaccharides of *Geoffroea spinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. *Carbohydrate Polymers.* 124: 208–215.
- Spite M., Norling L.V., Summers L., Yang R., Cooper D., Petasis N.A., Flower R.J., Perretti M., Serhan C.N. (2009). Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature.* 461(7268): 1287-1291.
- Suchard S.J., Nakamura T., Abe A., Shayman J.A., Boxer L.A. (1994). Phospholipase D-mediated diradylglycerol formation coincides with H₂O₂ and lactoferrin release in adherent human neutrophils. *The Journal of biological chemistry.* 269(11): 8063-8068.

- Takada K., Ohno N., Yadomae T. (1994). Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production in vivo. *Infect Immun* 62: 1171–1175.
- TALARICO L.B., PUJOL C.A., ZIBETTI R.G.M., FARÍA P.C.S., NOSEDA M.D., DUARTE M.E.R., et DAMONTE E.B. (2005). The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research*. 66: 103-110.
- Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M.A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Frontiers in immunology*. 5: 508.
- Theilgaard-Mönch K., Jacobsen L.C., Borup R., Rasmussen T., Bjerregaard M.D., Nielsen F.C., Cowland, J.B., and Borregaard N. (2005). The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood*. 105: 1785-796.
- Theilgaard-Monch K., Knudsen S., Follin P., Borregaard N. (2004). The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J. Immunol*. 172(12): 7684-7693.
- TONG H., LIANG Z., WANG G. (2008). Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L., *Carbohydrate Polymers*. 71: 316-323.
- 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. *Carbohydr Polym*. 92(2):1071-7.
- Torres M., Hall F.L., O'Neill K. (1993). Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *The Journal of Immunology*. 150(4): 1563-1577.
- Turner J., Cho Y., Dinh N.N., Waring A.J., Lehrer R.I. (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 2206–2214.
- Underhill D.M., Ozinsky A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current opinion in immunology*. 14(1): 103-110.
- Uriarte S.M., Rane M.J., Luerman G.C., Barati M.T., Ward R.A., Nauseef W.M., McLeish K.R. (2011). Granule Exocytosis Contributes to Priming and Activation of the Human Neutrophil Respiratory Burst. *Journal of immunology (Baltimore., M.d. : 1950)*. 187(1): 391-400.
- Vignais P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 59: 1428-59.

- von Vietinghoff S. and Ley K. (2009). IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J. Immunol.* 183: 865–873.
- Wagner H. (1990). Search for plant derived natural-products with immunostimulatory activity (Recent advances). *Pure Appl Chem.* 62:1217–22.
- Wagner H., Stuppner H., Schafer W., Zenk M. (1988). Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. *Phyto-chemistry.* 27: 119-126.
- Ward P.A. (2010). Acute and Chronic Inflammation. In: "Serhan C.N., Ward P.A., Gilroy D.W. (ed). *Fundamentals of Inflammation*": Cambridge University Press. Pp: 1-16.
- Wasser., S.P., Weis., A.L., (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.* 19: 65-96.
- Wasser., S.P., (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 258-274.
- Weill B., Batteux F., Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et reactions inflammatoires. Eds., De Boeck Universite (Paris), Pp: 12-23.
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 80:5:p 617-53.
- Wolf K., Friedl P. (2011). Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in cell biology.* 21(12): 736-744.
- Worthen G.S., Avdi N., Buhl A.M., Suzuki N., Johnson G.L. (1994). FMLP activates Ras and Raf in human neutrophils. Potential role in activation of MAP kinase. *The Journal of clinical investigation.* 94(2): 815-823.
- Wright H.L., Moots R.J., Edwards S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology.* 10(10): 593-601.
- WU Y., CUI S.W., TANG J., Wang Q., GU X. (2007). Preparation., partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited *Sterculia* seeds. *Carbohydrate polymers.* 70: 437–443.
- Xiang L., Stephen Sze C.W., Ng T.B., Tong Y., Shaw P.C., Sydney Tang C.W., Kalin Zhang Y.B. (2013). Polysaccharides of *Dendrobium officinale* inhibit TNF- α -induced apoptosis in A-253 cell line. *Inflamm Res.* 62(3):313-24.
- Xiao J., E.C. Liong., Y.P. Ching., R.C. Chang., K.F. So., M.L. Fung., G.L. Tipoe. (2012). *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation. *J. Ethnopharmacol.* 139: 462–470.

-
- Xiao J., F. Xing., J. Huo., M.L. Fung., E.C. Liong., Y.P. Ching., A. Xu., R.C. Chang., K.F. So., G.L. Tipoe. (2014b). *Lycium barbarum* polysaccharides therapeutically improve hepatic functions in non-alcoholic steatohepatitis rats and cellular steatosis model. *Sci. Rep.* 4: 5587.
- Xiao J., Y. Zhu., Y. Liu., G.L. Tipoe., F. Xing., K.F. So (2014a). *Lycium barbarum* polysaccharide attenuates alcoholic cellular injury through TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway. *Int. J. Biol. Macromol.* 69: 73–78.
- Xiao L., Ng T.B., Feng Y.B., Yao T., Wong J.H., Yao RM., Li L., Mo F.Z., Xiao Y., Shaw P.C., Li Z.M., Sze S.C., Zhang K.Y. (2011). *Dendrobium candidum* extract increases the expression of aquaporin-5 in labial glands from patients with Sjogren's syndrome. *Phytomedicine.* 18: 194–8.
- Xiao., J., E.C. Liong., Y..P. Ching., R.C. Chang., M.L. Fung., A.M. Xu., K.F. So., G.L. Tipoe. (2013). *Lycium barbarum* polysaccharides protect rat liver from non-alcoholic steatohepatitis induced injury. *Nutr. Diabetes* 3: e81.
- Xie G., Schepetkin I.A., Quinn M.T. (2007). Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. *Int Immunopharmacol.* 7(13):1639-50.
- Xie G., Schepetkin I.A., Siemsen D.W., Kirpotina L.N., Wiley J.A., Quinn M.T. (2008). Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartita*. *Phytochemistry.* 69(6):1359-71.
- XU H., ZHANG Y., ZHANG J., CHEN D. (2007). Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii*. *International Immunopharmacology.* 7: 175 - 182.
- Yang L., Hengzhuang W., Wu H., Damkiaer S., Jochumsen N., Song Z., Givskov M., Høiby N., Molin S. (2012). Polysaccharides serve as scaffold of biofilms formed by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65(2):366-76.
- YE CH.L., HU W.L., ET DAI D. H. (2011). Extraction of polysaccharides and the antioxidant activity from the seeds of *Plantago asiatica* L. *International Journal of Biological Macromolecules.* 49: 466– 470.
- Ye R.D., Boulay F., Wang J.M., Dahlgren C., Gerard C., Parmentier M., Serhan C.N., Murphy P.M. (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological reviews.* 61(2): 119-61.
- YE Y.N., SO H.L., LIU E.S.L., SHIN V.Y., CHO C.H. (2003). Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing., *Life Sciences.* 72: 925-932.

- Yu H., Lee H., Herrmann A., Buettner R., Jove R. (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature reviews. Cancer.* 14(11): 736-746.
- Zaman W., Mitsuyama T., Hatakenaka M., Kang D., Minakami S., Takeshige K. (1994). Phosphatidic acid induces the release of beta-glucuronidase but not lactoferrin from electropermeabilized human neutrophils. *Journal of biochemistry.* 115(2): 238-244.
- Zarbock A., Ley K. (2011). Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. *Arch Biochem Biophys.* 510: 112-119.
- Zhang L., Koyyalamudi S.R., Jeong S.C., Reddy N., Bailey T., Longvah T. (2013). Immunomodulatory activities of polysaccharides isolated from *Taxillus chinensis* and *Uncaria rhyncophylla*. *Carbohydr Polym.* 98(2):1458-65.
- ZOU Y. F., BARSETT H., HO G. T. T., INNGJERDINGEN K.T., DIALLO D., MICHAELSEN T. E., PAULSEN B. S., (2015). Immunomodulating pectins from root bark, stem bark, and leaves of the Malian medicinal tree *Terminalia macroptera* structure activity relations. *Carbohydrate Research.* 403: 167–173.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN RELATION AVEC LES TRAVAUX DE THESE

PUBLICATION :

Boukemara H, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Bendjeddou D, El Benna J, Marie JC. *Anvillea garcinii* extract inhibits the oxidative burst of primary human neutrophils. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Nov 3;16(1):433. PubMed PMID. 27809835.

COMMUNICATIONS:

1. **Boukemara H**, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Bendjeddou D, El Benna J, Marie JC. A polysaccharide extract from *Anvillea garcinii* is more efficient than the one from *Zygophyllum gaetulum* in inhibiting ROS production by neutrophils: Inhibition of PKC and p47phox phosphorylation. First Meeting of the Neutrophil Club. April 10th, 2015. FIAP, Paris, France.
2. **Boukemara H**, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Bendjeddou D, El Benna J, Marie JC. Les polysaccharides extraits de *Anvillea garcinii* sont plus efficaces que ceux de *Zygophyllum gaetulum* à inhiber la production de ROS par les neutrophiles humains: Inhibition de PKC et de la phosphorylation de p47phox. 9ème Club oxydase : NADPH oxydases de la Biochimie aux pathologies. Le 21 et 22 Mai 2015. Genève, Swiss.
3. **Boukemara H**, El Benna J, Marie JC. Les polysaccharides extraits d'*Anvillea garcinii* et de *Zygophyllum gaetulum* inhibent l'explosion oxydative des neutrophiles humains: Inhibition de PKC et de la phosphorylation de p47phox. 18^{ème} congrès du groupe Français de bioénergétique. Mitterwahr, 16-20 septembre 2015, France.