

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة فرحات عباس سطيف

UNIVERSITE DE FARHAT ABBAS –SETIF–

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences

Département de Biologie

Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

EN BIOLOGIE

Option : BIOCHIMIE ET PHYSIOLOGIE EXPERIMENTALE

Par

KARNOUF NASSIMA

THEME

**Effet des extraits de *Capparis spinosa* L. sur la
dégranulation et le chimiotactisme des
neutrophiles humains**

Soutenu le :

Devant la commission d'examen

Président	Pr. SENATOR Abderrahmane	Prof	Université de Sétif
Encadreur	Dr. BOURICHE Hamama	M.C	Université de Sétif
Examineurs	Pr. BAGHIANI Abderrahmane	Prof	Université de Sétif
	Dr. DAHAMNA Saliha	M.C	Université de Sétif

Remerciements

Louange au Dieu le tout puissant qui m'a accordé la foi, le courage et la patience pour mener ce travail à terme.

*Je tiens à remercier infiniment Dr. **BOURICHE Hamama** pour sa patience et ses conseils précieux qui m'ont été très utiles. Permettez-moi Mme de vous exprimer ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.*

*Mes sincères remerciements vont au Pr. **SENATOR Abderrahmane** pour avoir accepté de présider le jury de soutenance de ce mémoire, ainsi qu'aux Pr. **BAGHIANI Abderrahmane** et Dr. **DAHAMNA Saliha** pour avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*Mes remerciements sont destinés aussi à : Melle **BELAMMBRI SA**, Mme **BOUDOUKHA C**, tous mes collègues et amis et tous ce qui ont contribué à la réalisation de ce travail pour leur aide et leur soutien.*

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail

à mes chers parents, à ma famille

ainsi qu'à tous mes amis.

Résumé

L'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques (E-Met) et aqueux (E-Aq) des bourgeons floraux et des feuilles de *Capparis spinosa* a été étudiée *in vitro* dans la présente étude. Le potentiel anti-inflammatoire des extraits est évalué par l'investigation de leurs effets sur la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles humains. L'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles stimulés par le formyl-Met-Leu-Phe/ cytochalasine B (fMLP/CB), ou par le zymosan opsonisé (ZOP) par le sérum humain est exploitée pour estimer la dégranulation de ces cellules, alors que la migration des neutrophiles induite par l'fMLP est étudiée à l'aide d'une chambre de chimiotactisme (48-micro well chemotaxis chamber). Les résultats obtenus montrent que la dégranulation des neutrophiles activés par le fMLP /CB ou par le ZOP est significativement ($p < 0,05$) inhibée et d'une manière concentration-dépendante par l'E-Met des bourgeons et des feuilles de la plante. Dans le cas des neutrophiles fMLP/CB-stimulés, cette inhibition est de 67% et 65% à 100 $\mu\text{g/ml}$ de l'E-Met des bourgeons et feuilles respectivement, cependant, dans le cas des neutrophiles stimulés par le ZOP l'inhibition est de 43%, 40% respectivement. De même, ces deux extraits ont exercé un effet inhibiteur important sur la migration des neutrophiles vers l' fMLP avec des IC_{50} de 56,25 $\mu\text{g/ml}$ et 51,25 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. D'autre part, les E-Aq des deux parties de la plante à 50 $\mu\text{g/ml}$ ont exercé une inhibition faible (20%) mais significative ($p < 0,05$) sur la dégranulation des neutrophiles-fMLP/CB stimulés, sans affecter la dégranulation induite par le ZOP. L'extrait aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier a présenté un effet inhibiteur remarquable avec des IC_{50} de 75,55 $\mu\text{g/ml}$ et 63,67 $\mu\text{g/ml}$ respectivement sur le chimiotactisme des neutrophiles vers l'fMLP.

Mots clés : Neutrophile, Dégranulation, Chimiotactisme, *Capparis spinosa*, Anti-inflammatoire.

ملخص

قدّر في هذه الدراسة الفعل المضاد للالتهاب لكل من المستخلص الميثانولي (E-Met) والمائي (E-Aq) لأوراق وبراعم أزهار نبتة الكبار *Capparis spinosa*، وذلك عن طريق اختبار تأثيرها على إفراز حبيبات الخلايا المتعادلة للإنسان المحفزة بـ fMLP/CB أو Zymosan opsoné (ZOP). كما أُختبر أيضا تأثير هذه المستخلصات على الهجرة الموجهة لهذه الخلايا نحو عامل الجذب الكيميائي fMLP. بينت النتائج أن لـ E-Met لكل من الأوراق والبراعم تأثيرا مثبتا معنويا ($p < 0.05$) متعلقا بالتركيز على إفراز الحبيبات مع كلا المحفزين، والذي يتراوح بين 65% و 67% في حالة الخلايا المحفزة بـ fMLP/CB وبين 40% و 43% في حالة الخلايا المحفزة بـ ZOP عند تركيز 100 ميكروغرام/ملل. بالإضافة إلى ذلك أظهر E-Met للأوراق والبراعم تأثير مثبتا معنويا معتبرا على هجرة الخلايا المتعادلة نحو fMLP. قدّر التركيز المثبط لـ 50% من الهجرة (IC_{50}) بـ 51.25 و 56.25 ميكروغرام/ملل على التوالي. من جهة أخرى، تبين أن لـ E-Aq للأوراق والبراعم تأثيرا مثبتا ضعيفا (20%)، لكنه معنويا على إفراز حبيبات الخلايا المتعادلة المنشطة بـ fMLP/CB، دون أن يؤثر على إفرازها في حالة التنشيط بـ ZOP. كما ثبتت الهجرة الموجهة للخلايا المتعادلة نحو fMLP تنبيطا ملحوظا وقدّر التركيز المثبط لـ 50% من الهجرة الموجهة بـ 63.67 و 75.55 ميكروغرام/ملل على التوالي.

الكلمات المفاتيح: الخلايا المتعادلة، إفراز الحبيبات، الهجرة الموجهة، *Capparis spinosa*، مضادات الالتهاب.

Abstract

The anti-inflammatory activity of the methanolic and aqueous extracts of flower buds and leaves of *Capparis spinosa* were investigated in this study. The anti-inflammatory potential was evaluated by testing the effects of these extracts on neutrophil degranulation stimulated by formyl-Met-Leu-Phe/cytochalasine B (fMLP/CB) or by opsonized zymosan (ZOP) and chemotaxis induced by fMLP. Neutrophil degranulation was measured using elastase release as a marker, while the neutrophil migration was studied using 48-micro well chemotaxis chamber. Results revealed that the degranulation was significantly ($p < 0.05$) inhibited by the methanolic extracts. Effectively, at 100 $\mu\text{g/ml}$ of flower buds and leaf extracts, the inhibitions were 67% and 65% respectively in fMLP/CB-stimulated neutrophil, however, in opsonized zymosan activated neutrophils, the inhibitions were 43%, 40% respectively. In the same way, the treatment of neutrophils with these two extracts represent a strong inhibitory effect on their chemotactic toward fMLP with IC_{50} of 56.25 $\mu\text{g/ml}$ and 51.25 $\mu\text{g/ml}$ for the flower buds and the leaves respectively. On the other hand, at 50 $\mu\text{g/ml}$, the aqueous extract of the two parts of the plant inhibited weakly (20%) but significantly ($p < 0.05$) the degranulation of neutrophil-fMLP /CB stimulated. No effect was showed on the deganulation of the opsonized zymosan-neutrophil activated. Moreover, these two extracts showed an important inhibitory effect on the chemotaxis of the neutrophil toward fMLP with IC_{50} of 75.55 $\mu\text{g/ml}$ and 63.67 $\mu\text{g/ml}$ respectively.

Key words: Neutrophil, Degranulation, Chemotaxis, *Capparis spinosa*, Anti-inflammatory.

LISTE DES ABBREVIATIONS

BPI	: Bactericidal/permeability increasing protein
CRISP	: Cystein-rich secretory protein
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
G-CSF	: Granulocyte-colony-stimulating factor
GM-CSF	: Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
hCAP	: Human cathelicidin antimicrobial protein
ICAM	: Inter cellular adhesion molecule
ITAM	: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAM	: Junctional adhesion molecule
JNK	: c-Jun-N-terminal protein kinase
LFA	: Lymphocyte function-associated antigen
LPS	: Lipopolysaccharide
Mac	: Macrophage antigen
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MEK	: MAP kinase kinase
MIP	: Macrophage inflammatory protein
NGAL	: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NSF	: N-ethylmaleimide-sensitive-factor
PAF	: Platelet activating factor
PECAM	: Platelet-endothelial cell adhesion molecule
PI3K	: Phosphatidyl-inositol-3 kinase
SCAMP	: Secretory carrier membrane protein
SGP-28	: Specific granule protein of 28
SNAP	: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein
SNARE	: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
TNF	: Tumor necrosis factor
uPA	: Urokinase-type plasminogen activator
VAMP	: Vesicle associated membrane protein
VCAM	: Vascular cell adhesion molecule
VLA	: Very late activation antigen

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

- Figure 1** : Granulocyte neutrophile. 2
- Figure 2** : Processus en cascade menant au recrutement des neutrophiles vers le site inflammatoire. 3
- Figure 3** : Molécules d'adhésion et leurs ligands impliqués dans la migration endothéliale des neutrophiles. 5
- Figure 4** : Polarisation d'un neutrophile. 9
- Figure 5** : Modèle SNARE proposé pour expliquer la libération des granules du neutrophile. 15
- Figure 6** : Rôle mécanique des SNAREs proposé dans le rapprochement des membranes vésiculaire et plasmique. 16
- Figure 7** : Production de différentes espèces réactives de l'oxygène par le neutrophile. 17
- Figure 8** : Métabolisme de l'acide arachidonique. 20
- Figure 9** : Voies de transduction du signal cellulaire impliquées dans la réponse du neutrophile stimulé par le fMLP ou par le zymosan opsonisé. 22
- Figure 10** : Photographies de la plante *Capparis spinosa*. 31
- Figure 11** : Principales étapes d'isolement des neutrophiles à partir du sang humain. 38
- Figure 12** : Photographie de la chambre de chimiotactisme (48-micro well chemotaxis chamber). 42
- Figure 13** : Cytotoxicité des extraits du câprier et des différentes substances utilisées sur les neutrophiles. 44
- Figure 14** : Effet des extraits du câprier et des autres substances utilisées sur l'activité de l'elastase. 46
- Figure 15** : Effet inhibiteur des extraits méthanoliques du câprier sur l'activité de l'elastase des neutrophiles humains. 47
- Figure 16** : Activation de la dégranulation des PMNs par le fMLP/CB et par le zymosan opsonisé. 48
- Figure 17** : Effet des extraits méthanoliques des bourgeons floraux (**A**) et des feuilles (**B**) du câprier sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP/CB ou par le zymosan opsonisé. 49

Figure 18 : Effets des extraits méthanoliques du câprier sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP/CB ou par le zymosan opsonisé.	51
Figure 19 : Effet des extraits aqueux des bourgeons floraux (A) et des feuilles (B) du câprier sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP/CB ou par le zymosan opsonisé.	52
Figure 20 : Effets des extraits du câprier, de la rutine et de la quercétine sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP/CB.	53
Figure 21 : Adhésion des neutrophiles humains sur les filtres après leur migration en absence (A) et en présence de l'fMLP (B).	54
Figure 22 : Effet de l'extrait méthanolique (A) et d'extrait aqueux (B) du câprier sur le chimiotactisme des PMNs humains.	56
Figure 23 : Effets des extraits du câprier, de la rutine, de la quercétine et de l'aspirine sur la migration des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP.	57

TABLEAUX

Tableau 1 : Constituants majeurs des différents granules des neutrophiles humains.	11
Tableau 2 : Certaines plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires.	28

SOMMAIRE

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Polymorphonucléaire neutrophile	1
2. Fonctions des neutrophiles	2
2. 1. Migration des neutrophiles.....	2
2.1.1. Marginalisation et roulement des neutrophiles le long de l'endothélium vasculaire...	3
2.1.2. Activation et adhésion ferme des neutrophiles	4
2.1.3. Migration trans-endothéliale des neutrophiles	7
2.1.4. Migration tissulaire des neutrophiles	7
2.1.5. Mécanisme du chimiotactisme des neutrophiles.....	8
2.2. La phagocytose.....	9
2.3. Dégranulation des neutrophiles	10
2.3.1. Différents granules des neutrophiles	10
2.3.2. Mécanisme de dégranulation des neutrophiles.....	13
2.4. L'explosion oxydative.....	16
2.5. Libération des médiateurs	18
2.5.1. Médiateurs peptidiques	18
2.5.2. Médiateurs lipidiques	19
3. Transduction du signal dans le neutrophile	21
3.1. Voies d'activation par le formyl méthyl-leucyl-phénylalanine.....	21
3.2. Voies d'activation par le zymosan opsonisé	25
4. Dysfonctionnement du neutrophile	25
5. Les anti-inflammatoires	26
5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens	26
5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens	26
5. 3. Anti-inflammatoires d'origine végétale	27
6. La plante <i>Capparis spinosa</i> L.	29
6.1. Classification de la plante <i>Capparis spinosa</i> L.....	30
6.2. Aspect botanique de <i>Capparis spinosa</i>	30
6.3. Composition chimique de la plante	30
6.4. Usage traditionnelle du câprier	33
6.5. Activités biologiques du câprier.....	33

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES	35
1. Matériel	35
1.1. Réactifs	35
1.2. Matériel biologique	35
1.2.1. Sang humain	35
1.2.2. Matériel végétal.....	35
2. Méthodes	35
2.1. Préparation des solutions de travail.....	35
2.2. Extraction	36
2.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique de <i>Capparis spinosa</i>	36
2.2.2. Préparation de l'extrait aqueux de <i>Capparis spinosa</i>	37
2.3. Préparation des neutrophiles humains	37
2.3.1. Isolement des neutrophiles humains	37
2.3.2. Comptage des neutrophiles	37
2.3.3. Viabilité des neutrophiles isolés.....	39
2.3.4. Pureté des neutrophiles isolés	39
2.4. Evaluation de la cytotoxicité des substances testées	39
2.5. Evaluation de l'activité de l'élastase	40
2.6. Effet des extraits du câprier sur la dégranulation	40
2.7. Effet des extraits du câprier sur le chimiotactisme	41
3. Analyse statistique	42
RESULTATS	43
1. Préparation des extraits de <i>Capparis spinosa</i>	43
2. Préparation des neutrophiles humains.....	43
3. Effet Cytotoxique des extraits du câprier	43
4. Etude de la dégranulation des neutrophiles humains	43
4.1. Effet des extraits du câprier sur l'activité de l'élastase.....	45
4.2. Effet des extraits du câprier sur la dégranulation	45
4.2.1. Effet des extraits méthanoliques du câprier sur la dégranulation.....	45
4.2.2. Effet des extraits aqueux du câprier sur la dégranulation	50
5. Etude du chimiotactisme des neutrophiles humains	54
5.1. Effet des extraits méthanoliques du câprier sur le chimiotactisme	55
5.2. Effet des extraits aqueux du câprier sur le chimiotactisme	55

DISCUSSION	58
1. Préparation des extraits de <i>Capparis spinosa</i>	58
2. Utilisation des neutrophiles humains	58
3. Evaluation de la toxicité des extraits du câprier envers les neutrophiles	59
4. Effet des extraits du câprier sur l'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles.....	60
5. Effet des extraits du câprier sur la dégranulation des neutrophiles.....	61
6. Effet des extraits du câprier sur le chimiotactisme des neutrophiles	64
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	66
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67

INTRODUCTION

Les polymorphonucléaires neutrophiles constituent un des puissants systèmes de défense contre les agents pathogènes et qui jouent un rôle primordial dans le processus inflammatoire. Arrivés au site enflammé par chimiotactisme, les neutrophiles neutralisent les agents agresseurs par la phagocytose, la libération des enzymes hydrolytiques et la production des espèces réactives de l'oxygène. Cependant, lorsque les mécanismes de régulation de ces différentes réponses échouent, le recrutement continu des neutrophiles vers le site inflammatoire et leur activation excessive causent des lésions tissulaires graves, qui sont à l'origine de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la goutte, l'asthme, l'Alzheimer et le cancer.

La plupart des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens présentent plusieurs effets secondaires néfastes. A cet égard, l'homme s'est orienté vers la phytothérapie pour chercher et découvrir empiriquement les moyens de sauvegarder leur santé. L'utilisation des plantes en thérapeutique est très ancienne, actuellement elle connaît un regain d'intérêt auprès du public, mais les règles de leurs utilisations manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne. Ces dernières années, plusieurs recherches se sont orientées vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sécurité et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude dont l'objectif essentiel consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Capparis spinosa* connu en Algérie sous le nom Kabbar (câprier). Cette plante est utilisée en cuisine algérienne, comme elle est utilisée en médecine traditionnelle pour soulager certaines maladies inflammatoires.

La présente étude est une contribution à :

- * La préparation des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles et des bourgeons floraux de *Capparis spinosa*.

- * L'étude de l'effet de ces extraits sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP ou par le zymosan opsonisé.

- * Et en fin, à l'étude de l'effet de ces extraits sur la migration des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Polymorphonucléaire neutrophile

Les neutrophiles, aussi fréquemment nommés les leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs), ont été décrits pour la première fois par Paul Ehrlich dans les années 1900. Ils sont caractérisés par un noyau polylobé et de nombreux granules cytoplasmiques (figure 1). D'ailleurs, le nom neutrophile provient du fait qu'il est coloré par un mélange de colorants acides et basiques, finalement un colorant neutre (Borregaard et Cowland, 1997). Représentant 50% à 70% des globules blancs totaux dans le sang, ils sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine. Dans la sous-famille des granulocytes, les neutrophiles sont les plus nombreux, ils représentent plus de 95% de cette population cellulaire. Les neutrophiles sont des atouts très importants pour l'immunité innée, et surtout pour la réaction inflammatoire, car ils sont les premiers leucocytes à migrer, en très grand nombre, vers le site enflammé. De plus, ils possèdent des outils très efficaces pour éliminer les invasions bactériennes de l'organisme.

Comme toutes les cellules du système immunitaire, les neutrophiles sont formés dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique. Selon les concentrations des facteurs de croissance qui l'entourent, cette cellule peut se différencier et devenir une cellule progénitrice myéloïde, menant à la formation des monocytes, des macrophages et des neutrophiles, ou se transformer en cellule lymphoïde, menant à la formation des lymphocytes. La présence combinée de GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor*) et d'interleukine (IL)-3 favorise la différenciation de la lignée myéloïde et l'addition d'IL-6 permet d'avancer un peu plus dans la cascade jusqu'au progéniteur des granulocytes/macrophages. Il suffit ensuite que ce précurseur subisse quelques étapes de maturation supplémentaires pour donner un neutrophile prêt à passer dans la circulation sanguine et à défendre l'organisme (Dale *et al.* 2008). Dans la moelle osseuse le processus de maturation des neutrophiles prend approximativement 14 jours, avec une production quotidienne de 10^8 à 10^{11} neutrophiles avec une augmentation en cas d'infection (Seely *et al.*, 2003). Les neutrophiles en circulation et en périphérie ont une durée de vie relativement courte. Une fois passés de la moelle osseuse à la circulation sanguine, ils patrouillent environ 7 à 12 heures. Par contre, dans un contexte inflammatoire, ils peuvent survivre jusqu'à quelques jours afin d'accomplir leur travail.

Dans la circulation les neutrophiles représentant plus de 90% des phagocytes circulaires forment deux pools, un pool circulant présent au centre du flux sanguin et un pool marginé occupant les périphéries des vaisseaux sanguin notamment au niveau des veinules

postcapillaires. Cette marginalisation, la forme sous laquelle les neutrophiles sont stockés dans les capillaires de certains tissus, facilite une mobilisation rapide des neutrophiles en réponse à une infection ou un stress (Seely *et al*, 2003).

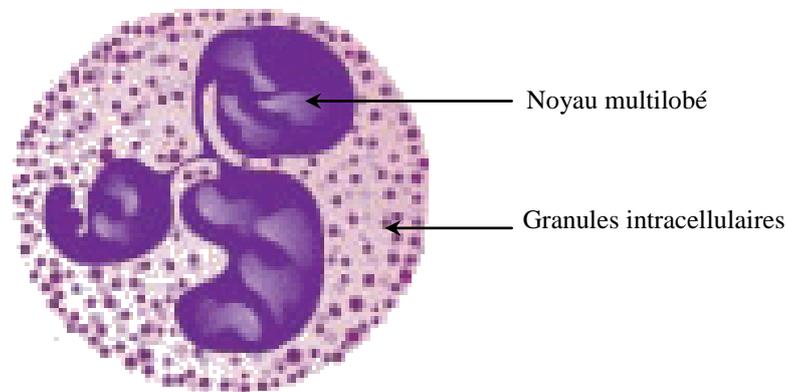


Figure 1: Granulocyte neutrophile.

2. Fonctions des neutrophiles

Suite à leur migration transendothéliale vers le site inflammatoire, le neutrophile entreprend sa fonction d'élimination des agents pathogènes par la phagocytose, la dégranulation et l'explosion oxydative.

2.1. Migration des neutrophiles

Pour se rendre au site inflammatoire, les neutrophiles doivent d'abord quitter la circulation sanguine et migrer à travers le vaisseau sanguin vers les tissus lésés. Les cellules endothéliales vasculaires activées par l'agression vont exprimer des molécules d'adhésion favorisant dans un premier temps une adhésion réversible des neutrophiles à l'endothélium, ainsi leur enrroulement le long de la paroi vasculaire. Par ailleurs, l'expression et l'activation de nouvelles molécules d'adhésion sur les neutrophiles et leurs récepteurs endothéliaux sous le contrôle de divers médiateurs inflammatoires est également nécessaire à son adhésion ferme à l'endothélium et alors leur extravasation. À l'extérieur de la circulation, les neutrophiles sont attirés par un gradient de facteurs chimiotactiques (figure 2).

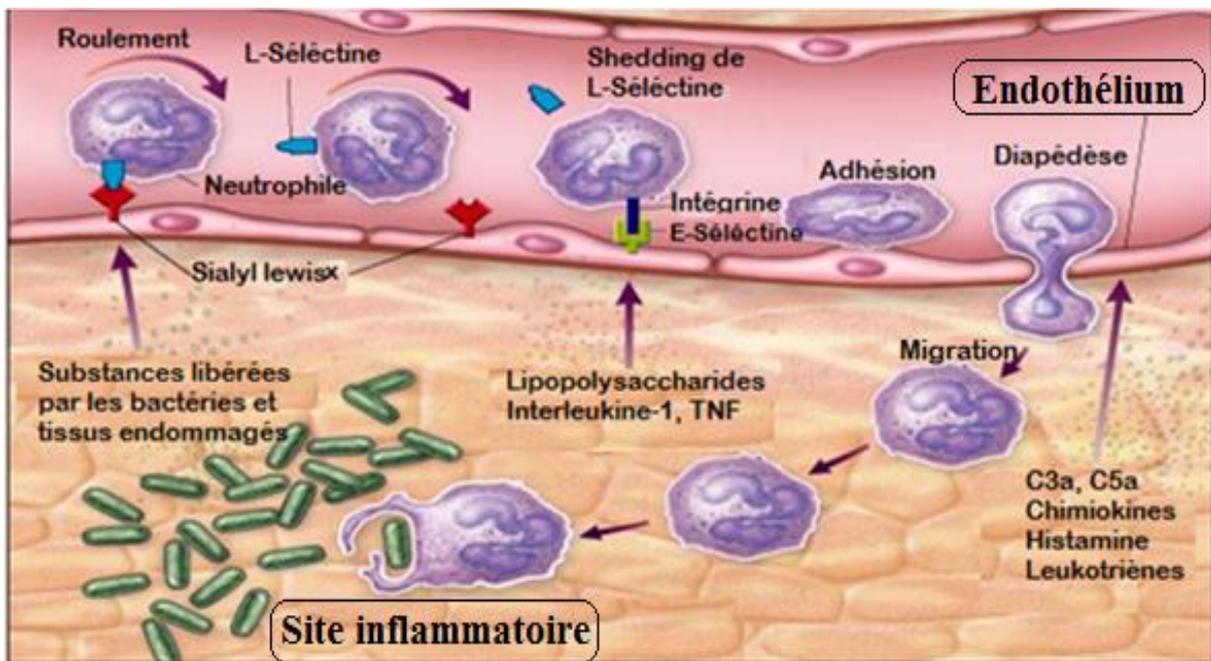


Figure 2: processus en cascade menant au recrutement des neutrophiles vers le site inflammatoire (Seely *et al*, 2003).

2.1.1. Marginalisation et roulement des neutrophiles le long de l'endothélium vasculaire

La marginalisation des neutrophiles est le processus par lequel les PMNs quittent le centre de flux sanguin vers la périphérie des vaisseaux sanguin et interagissent avec l'endothélium vasculaire. Ce mouvement des neutrophiles est dirigé par des forces physiques générées entre les interactions érythrocytes-leucocytes. En effet, dans les veines post-capillaires les érythrocytes naviguent très rapidement au centre des vaisseaux poussant les grands leucocytes incluant les neutrophiles vers la périphérie des vaisseaux. Ce rôle clé des érythrocytes dans le processus de marginalisation a été étudié *in vivo*, dont lequel aucune marginalisation de leucocyte n'a été observée en absence des globules rouges (Seely *et al*, 2003).

En condition normale, l'endothélium vasculaire forme une barrière non-adhésive entre le sang et les tissus. En revanche dans les régions enflammées, l'endothélium subit divers changements dans l'expression de molécules d'adhésion. Des cytokines et des médiateurs, issus directement (LPS) ou indirectement (IL-1, TNF- α) de l'agression, agissent sur l'endothélium et induisent l'expression des sélectines. Les neutrophiles marginalisés vont alors reconnaître ces ligands nouvellement exprimés et interagir de façon lâche avec l'endothélium. En effet, l'interaction sélectine-carbohydrate est de faible affinité, le neutrophile s'attache donc faiblement aux cellules endothéliales et le flux sanguin vient défaire cette interaction. Cette opération se répète de façon à ce que le neutrophile roule le long de l'endothélium (Tozeren *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 1999).

Les intégrines $\beta 2$ participeraient également dans le roulement des neutrophiles. Le roulement est diminué de moitié chez des souris déficientes en L-sélectine et en ICAM-1 comparativement à des souris seulement déficientes en L-sélectine (Steeber *et al.*, 1998). Des souris déficientes en LFA-1 ou Mac-1 révèlent une contribution égale et coopérative de chacune de ces molécules pour réduire la vitesse du roulement (Dunne *et al.*, 2002). Les leucocytes de souris déficientes en LFA-1 ou Mac-1 roulent à une vitesse environ deux fois plus élevée que ceux des souris sauvages. Ainsi, les interactions de faible affinité des intégrines $\beta 2$ avec ICAM-1 fonctionnent coopérativement avec les sélectines pour diminuer la vitesse de roulement (Zarbock et Ley, 2008).

Les sélectines, sont des glycoprotéines transmembranaires, ont une distribution restreinte au système vasculaire et leucocytaire. La famille des sélectines comprend trois types de molécules d'adhésions ; L- sélectines qui sont exprimées constitutivement à la surface de la plupart des leucocytes circulantes, les P-sélectines sont synthétisées de façon constitutive et stockées dans des compartiments intracellulaire et les E- sélectines qui sont des molécules d'adhésion ayant une distribution restreinte à la surface des cellules endothéliales activées. Contrairement au L-sel, l'expression d'E-sel est inducible par différents médiateurs inflammatoires (Wagner et Roth, 2000 ; Seely *et al.*, 2003). Les sélectines se lient à des structures saccharidiques présentes sur des glycoprotéines, des glycolipides des membranes leucocytaires ou sur l'endothélium vasculaire (figure 3). Ces ligands appartiennent à la famille des sialylcé, fucosylé et accessoirement sulfaté glucosaminoglycanes, appelés sialyl de Lewis x (S-Le^x) (Giembycz et Lindsay, 1999 ; Kelly *et al.*, 2007). Les sélectines servent à ralentir les leucocytes dans le but de favoriser leur roulement sur les cellules endothéliales et permettre l'établissement d'une adhésion ferme des neutrophiles au l'endothélium vasculaire (Wagner et Roth, 2000 ; Zarbock et Ley, 2008).

2.1.2. Activation et adhésion ferme des neutrophiles

En plus de l'augmentation de l'expression des E- et P-sel sur l'endothélium, les cytokines et les médiateurs issus du site de l'agression (IL-1, TNF- α) vont augmenter l'expression de ICAM-1 et induire ainsi la libération de facteurs chimiotactiques à la surface de l'endothélium tel que le IL-8, le PAF et LTB₄. A la suite de leur sécrétion, les chimiokines sont transportées dans le flux sanguin ou ancrées à la surface de l'endothélium par les glycosaminoglycanes (Middleton *et al.*, 2002). La liaison des chimiokines avec leurs récepteurs entraîne l'activation des neutrophiles et leur progression vers l'adhésion ferme sur l'endothélium (Alon et Feigelson, 2002 ; Rainger *et al.*, 1997).

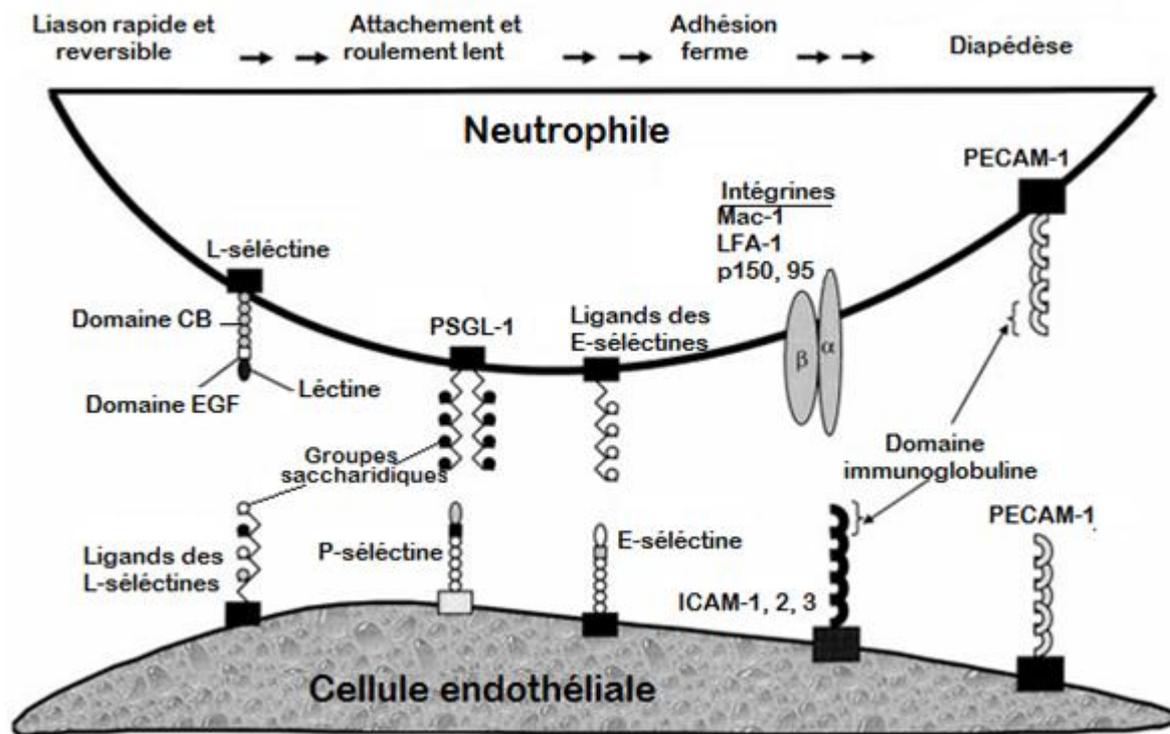


Figure 3: Molécules d'adhésion et leurs ligands impliqués dans la migration transendothéliale des neutrophiles (Wagner et Roth, 2000).

Cette adhésion est la conséquence d'un changement dans la conformation des intégrines et leur redistribution par leur groupement en cluster à la surface des neutrophiles, ce qui mène à une augmentation de leur affinité et de leur avidité envers leur ligands exprimées à la surface de l'endothélium (Stewart et Hogg, 1996 ; Hogg *et al.*, 2002).

Les intégrines, forment une large famille de glycoprotéines homologues transmembranaires, fonctionnent comme récepteurs cellulaires principales de la plus part des protéines extracellulaires. Toutes les intégrines sont des hétérodimères constituées de deux sous-unités α et β (figure 3). La portion extracellulaire interagit avec des ligands extracellulaires alors que le domaine cytoplasmique lie des molécules de signalisation et des composants du cytosquelette (Plow *et al.*, 2000 ; Van der Flier et Sonnenberg, 2001). Les intégrines sont exprimés de manière constitutive sous leur forme inactive à la surface de tous les leucocytes. En effet, c'est la dissociation et l'association de l'hétérodimère α/β qui détecte la forme active et inactive des intégrines. Plus précisément, les signaux cytoplasmiques issus de récepteurs couplés aux protéines G entraînent la phosphorylation du domaine

cytoplasmique de la sous-unité β , ce qui permet à la taline, une protéine adaptatrice du cytosquelette, de se lier à ce dernier. Cette liaison entraîne alors la dissociation des domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β puis un changement de conformation de l'intégrine qui va aboutir à son activation (Wegener *et al.*, 2007).

L'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium vasculaire est rendue possible principalement aux intégrines comportant la sous unité β_2 ($\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$) (Kelly *et al.*, 2007 ; Zarbock et Ley, 2008). Les intégrines LFA-1($\alpha_M\beta_2$) et Mac-1($\alpha_L\beta_2$) sont les principales à induire l'arrêt et la transmigration au site inflammatoire (Smith *et al.*, 1989 ; Furie *et al.*, 1991). L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium fait intervenir ainsi le p 150/95 ($\alpha_X\beta_2$) et le CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$). Le premier interagit avec le fibrinogène et le C3bi, alors que le dernier interagit avec la VCAM-1 et ICAM-3 (Van der Vieren *et al.*, 1995 ; Van der Vieren *et al.*, 1999).

Les plus importants ligands des β_2 intégrines appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, c'est une famille de glycoprotéines transmembranaires possédant un court domaine cytoplasmique, une région transmembranaire simple et un nombre variable de domaines immunoglobulines extracellulaires (Gahmberg *et al.*, 1997). Les molécules ICAMs, VCAMs et PECAMs font partie de cette famille. Elles sont exprimées à la surface des cellules endothéliales, les PECAMs et ICAMs sont également exprimées sur les leucocytes.

L'expression d'ICAM-1 est augmentée à la surface de l'endothélium en réponse à un stimulus inflammatoire (Hubbard et Rothlein, 2000). L'ICAM-1 est le ligand majeur des intégrines β_2 (LFA-1 et Mac-1) sur l'endothélium enflammé. Cette interaction est beaucoup plus forte que celle induite par les sélectines. Elle est à l'origine de l'adhésion ferme des neutrophiles sur l'endothélium. L'ICAM-2 et l'ICAM-3 ont également la capacité de lier LFA-1 toutefois avec une affinité moindre comparativement à l'ICAM-1 (De Fougerolles *et al.*, 1994). Contrairement à l'ICAM-1, l'ICAM-2 est exprimée constitutivement par l'endothélium vasculaire. D'autre part, l'ICAM-3 est exprimée sur les leucocytes mais non sur l'endothélium. Les ICAMs ont également des fonctions de signalisation. La liaison de l'ICAM-1 a pour conséquence l'augmentation de la sécrétion de cytokines et de l'expression de protéines membranaires (Hubbard et Rothlein, 2000).

VCAM-1, comme ICAM-1, est exprimée en faible quantité sur les cellules endothéliales au repos et se trouve en grande quantité en réponse des stimuli pro-inflammatoires. Son ligand est $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4), exprimé par la plupart des leucocytes, mais elle peut également se lier avec le $\alpha_4\beta_7$ (Carter et Wicks, 2001). En plus de son implication

dans l'adhésion ferme des neutrophiles, le VCAM-1 joue un rôle dans le roulement des neutrophiles via VLA-4 (Alon *et al.*, 1995).

2.1.3. Migration trans-endothéliale des neutrophiles

Après adhésion sur l'endothélium, les neutrophiles vont migrer à travers la paroi vasculaire vers les tissus, processus connu sous le terme de diapédèse. Quatre-vingt-dix pourcent des cellules qui interagissent avec un endothélium activé migrent subséquemment en se faufilant à des jonctions bi- et tri-cellulaires (Burns *et al.*, 1997 ; Gopalan *et al.*, 2000). Dans cette voie, l'ICAM-1 et le VCAM-1 jouent un rôle important.

Les jonctions cellulaires de l'endothélium sont formées par l'interaction de diverses molécules d'adhésions telles que PECAM-1, CD99, les JAMs, les VE-cadhérines, les β -caténines, les occludines et les claudines (Johnson-Leger *et al.*, 2000). Les leucocytes vont interagir avec les molécules PECAM-1, CD99 et JAMs, exprimées constitutivement aux jonctions lors de la diapédèse (Vestweber, 2002 ; Muller, 2003). Un mécanisme de fermeture-éclair assure la diapédèse des leucocytes sans que la barrière endothéliale ne soit perturbée (Muller, 2003). Des interactions homotypiques ont lieu entre les PECAM-1 des neutrophiles et des cellules endothéliales. Il en est de même pour CD99 (Lou *et al.*, 2007). Les JAMs (JAM-A,-B,-C) se lient aux intégrines présentes à la surface des leucocytes (LFA-1, VLA-4 et Mac-1) (Ostermann *et al.*, 2002 ; van Buul *et al.*, 2004). Les JAM-A et -C existent aussi sur les leucocytes et peuvent également interagir avec l'endothélium par des interactions homotypiques (Muller, 2003). Les cellules transmigrent sont caractérisées par une polarisation et la formation d'un pseudopode à l'avant. Ce pseudopode s'insinue entre les jonctions cellulaires des cellules endothéliales puis mène le neutrophile dans sa traversée de la membrane basale et du tissu.

2.1.4. Migration tissulaire des neutrophiles

Après la traversée de l'endothélium, les neutrophiles vont avoir un dernier obstacle à franchir qui est la membrane basale péri-vasculaire. Le mécanisme par lequel les cellules traversent cette membrane est encore mal défini. Certaines protéases sont en effet régulées à la hausse peu de temps après la migration transendothéliale, afin de contribuer à la traversée de la membrane basale. Puis les neutrophiles vont enfin entrer dans le tissu et rencontrer la matrice extracellulaire pour se diriger ensuite jusqu'au site de l'agression par chimiotactisme.

Dans le milieu interstitiel, les neutrophiles sont guidés par un gradient de facteurs chimiotactiques et migrent par des mouvements amiboïdes vers le site de l'agression. Pour se frayer un chemin à travers la matrice extracellulaire, ils libèrent des enzymes de dégradation

de cette dernière (Ellis et Murphy, 2001). Toutefois, les neutrophiles pourraient également naviguer à travers la matrice extracellulaire indépendamment de l'activité de protéases en utilisant les portions élastiques de ces fibres et se faufiler à travers les ouvertures générées (Mandeville *et al.*, 1997). Le processus de migration implique des interactions complexes entre la membrane de la cellule et la matrice extracellulaire et une réorganisation permanente de la forme de la cellule. De ce fait les neutrophiles vont interagir avec les composants de la matrice extracellulaire par le biais principalement des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ (Giembycz et Lindsay, 2000).

2.1.5. Mécanisme du chimiotactisme des neutrophiles

La migration est un processus cyclique dans lequel la cellule étend une protrusion à l'avant et rétracte son arrière. Pour amorcer ce phénomène un agent chimiotactique va induire la polarisation initiale. En effet, durant les quelques secondes qui suivent l'exposition des neutrophiles à un gradient de chimioattractants, la cellule projette dans le sens du gradient de fines extensions cytoplasmiques riches en filaments d'actine organisées en faisceaux, appelées filopodes. Parallèlement à l'augmentation de la concentration des chimioattractants, le mouvement des neutrophiles est mieux orienté. La formation des pseudopodes latéraux est inhibée, pour que les neutrophiles acquièrent à la fin une forme totalement polarisée. Cette polarisation est caractérisée par la présence d'un pseudopode riche en filaments d'actine organisé en réseaux appelé lamellipode au pool intérieur de la cellule et par un uropode en forme de queue au pool postérieur (figure 4). Afin que la cellule avance, il faut que les protrusions s'attachent et se stabilisent pour fournir un moyen de traction à la cellule. L'adhésion via les intégrines fournit le moyen physique de cette traction. Cette force de traction est créée par les propriétés contractiles de la myosine II qui forme un réseau d'actinomyosine dans l'uropode de la cellule. La myosine II est ainsi localisée le long des régions latérales du neutrophile polarisé où elle contribue à augmenter la tension contractile et de former une barrière physique qui prévient la formation des pseudopodes latéraux (Eddy *et al.*, 2000).

Le déplacement du neutrophile dans le sens du gradient implique une série de conversions de l'actine G monomérique en actine F "filamenteuse" et vis versa (Samstag *et al.*, 2003). Au repos, 70% de l'actine du neutrophile se trouve sous forme G monomérique. L'activation de la polymérisation de l'actine G augmente la quantité de l'actine F.

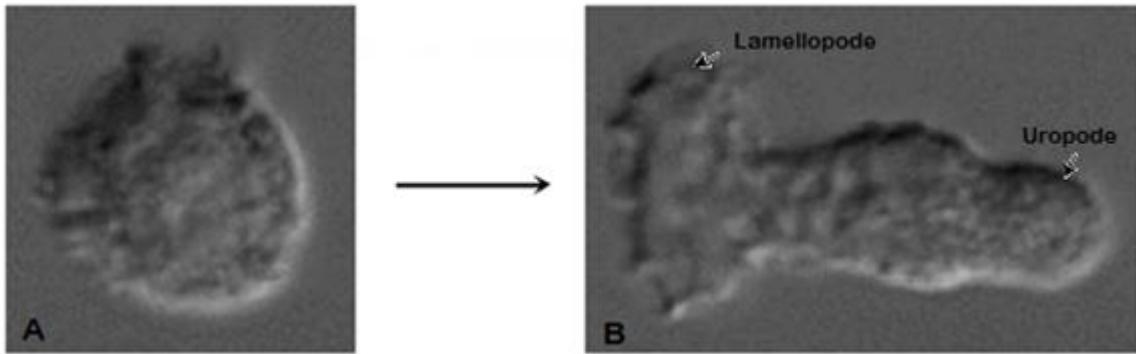


Figure 4: Polarisation d'un neutrophile. En présence de chimioattractant, le neutrophile change de morphologie d'une cellule assez ronde et lisse (A) à une cellule polarisée, allongée et plissée et présentant des pseudopodes pointant (B) vers les concentrations les plus fortes de chimioattractants (Weiner *et al.*, 1999).

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

2.2. La phagocytose

Les phagocytes, dont les neutrophiles font partie, possèdent des récepteurs spécialisés dans la reconnaissance de leurs cibles. Classiquement, les neutrophiles internalisent des particules opsonisées. Les principaux récepteurs d'opsonines du neutrophile sont les récepteurs des fragments constants des immunoglobulines de type IgG (FcγR) et les récepteurs du complément (CR). Les premiers vont reconnaître les fragments constants libres des anticorps fixés par leur partie variable au corps étranger et les seconds vont se lier aux particules recouvertes de fragments du complément. Les principaux FcγR chez les neutrophiles humains sont les FcγRIIA (CD32) et FcγRIIIb (CD16). Le récepteur de haute affinité FcγRI (CD64) est utilisé de façon prédominante lorsque le neutrophile est potentialisé par l'interféron (McKenzie et Schreiber, 1998). Le fragment du complément C3bi est reconnu par l'intégrine β2 activée Mac-1 (CR3 ; CD11b/CD18) (Brown, 1991). A la suite de cette reconnaissance, les récepteurs se regroupent en clusters et déclenchent une signalisation intracellulaire qui implique la voie des tyrosines kinases et des protéines kinases. En fin, l'actine se polymérise et forme des pseudopodes qui se développent jusqu'à ce que la particule soit entièrement englobée dans une vacuole, le phagosome. Néanmoins, le mode d'internalisation diffère selon le type d'opsonine utilisé (Greenberg et Grinstein, 2002). Ces

récepteurs sont nécessaires à la reconnaissance mais également à l'internalisation et la dégradation. En plus, le neutrophile a également la capacité de reconnaître des motifs conservés chez les pathogènes par le biais d'autres récepteurs qui sont "Toll like receptors" (Blander *et al.*, 2004),

A la suite de la reconnaissance du corps étranger, les neutrophiles l'internalisent et amorcent divers mécanismes qui vont aboutir à la destruction des particules phagocytées. Pour ce faire, ils ont recours à deux mécanismes différents, l'un dépendant et l'autre indépendant de l'oxygène (Gougerot-Pocidallo et Halbwegs-Mecarelli, 2005). Ces mécanismes sont également responsables de la libération de composés toxiques dans le milieu extracellulaire.

2.3. Dégranulation des neutrophiles

Afin de détruire le corps étranger présent à l'intérieur du phagosome, les neutrophiles font recours à la libération du contenu de leurs granules. Les neutrophiles sont en effet des cellules porteuses d'un grand nombre de granules dont le contenu est riche en divers composants. La fusion des membranes des différents granules par des interactions protéiques avec la membrane du phagosome engendre la libération de leur contenu à l'intérieur du phagosome. La particule ingérée se trouve alors dans un environnement de haute toxicité qui mène à leur destruction. Les produits de cette digestion ainsi que les hydrolases seront libérées dans le milieu extracellulaire, et serviront à recruter d'autres leucocytes au niveau du foyer inflammatoire (Botting et Botting, 2000).

2.3.1. Différents granules des neutrophiles

Le neutrophile possède plusieurs granules qui constituent un important réservoir non seulement des protéines antimicrobiennes, des protéases et des composés de la flambée respiratoire, mais également des récepteurs membranaires pour les molécules d'adhésion endothéliales, des protéines de la matrice extracellulaire, produits bactériens et pour les médiateurs solubles de l'inflammation (tableau 1). Les granules des neutrophiles sont formées séquentiellement au cours de leur différenciation, elles sont issues à partir des vésicules de transport immature de Golgi qui fusionnent entre elles (Faurischou et Borregaard, 2003).

Les granulations des neutrophiles forment quatre groupes hétérogènes différents par leur taille, leur morphologie, leur densité et principalement par leur contenu spécifique en

Tableau 1: Constituants majeurs des différents granules des neutrophiles humains (Faurouchou et Borregaard, 2003).

	Granules azurophiles	Granules spécifiques	Granules à gélatinases	Granules sécrétoires
Matrice	Acide mucopolysaccharide α -Mannosidase Azurocidine BP1 (<i>Bactericidal/permeability increasing protein</i>) β -glycerophosphate Cathepsines, Defensines Elastase, Lysosyme Meyéloperoxidase N-acetyl- β -Glucosaminidase Priteinase-3, Sialidase Ubiquitine-protéine	B ₂ -Microglobuline Collagénase CRISP-3(SGP28) Gélatinase hCAP-18 (<i>Human cathelicidin antimicrobial protein</i>)-18 Histaminase Heparanase Lactoferrine Lysosyme NGAL uPA Sialidase Transcobalamine-1	Acétyltransférase B ₂ -Microglobuline CRISP-3 Gélatinase Lysosyme	Protéines plasmatiques (γ compris l'albumine)
Membrane	CD63, CD68 Presenilin 1 Stomatine	CD11/CD18 CD15, CD66, CD67 Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ Récepteur de l'fMLP Récepteur de fibronectine Sous-unité α de la protéine G Récepteur de laminine Leukolysine L'entigène NB1 Protéine de 19 KDa Protéine de 155 KDa RAP1, RAP2 SCAMP, SNAP-23,-25 Récepteur de thrombospondine Récepteur de TNF, VAMP-2 Récepteur de vitronectine	CD11/CD18 Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ Enzyme de déacétylase Récepteur de l'fMLP Leukolysine NRAMP-1 SNAP-23,-25 Récepteur de uPA H ⁺ -ATPase de type V	Phosphatase alcaline CD11/CD18 CD13 CD14 CD16 CR1 Récepteur C1a Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈ DAF (Deca-accelerting factor) Leukolysine VAPM-2

protéines (Gougerot-Pocidalò et Halbwechs-Mecarelli, 2005). Cette hétérogénéité est accordée aux facteurs de transcription myéloïde, qui régulent l'expression des différents granules en protéines. Alors il semble qu'il n'y a aucun adressage individuel pour ces protéines vers chaque type de granules, mais qu'au moment de leur synthèse elles s'accumulent dans le type de granules en train de se former (Faurshou et Borregaard, 2003).

a. Les granules azurophiles

Les granules azurophiles (primaires) sont les premiers granules formés au cours de la maturation des neutrophiles. Ils apparaissent dans la promyélocyte (Gougerot-Pocidalò et Halbwechs-Mecarelli, 2005). Les granules azurophiles sont divisées en deux sous-populations : les granules azurophiles pauvres en défensines formés en première dans la phase précoce de promyélocyte et les granules azurophiles riches en défensines qui apparaissent plus tardivement près de la phase de transition promyélocyte/myélocyte (Faurshou et Borregaard, 2003). Les granules primaires sont rarement sécrétés à l'extérieur de la cellule, fusionnant plutôt avec le phagosome pour détruire les microorganismes ingérés à l'aide de la myéloperoxydase, élastase, défensine, lysosyme, azurocidine et d'autres hydrolases.

b. Les granules spécifiques

Les granules spécifiques (secondaires) sont les premiers granules à peroxydase négatif, leur formation revient au stade de myélocyte. Ces granules sont riches en lactoferrine et en substances antimicrobiennes libérées dans le milieu extracellulaire plus facilement que les substances d'azurophiles comme : la cathélicidine hCAP (*Human cathelicidin antimicrobial protein*)-18, stockée sous forme inactive, est libérée et activée par l'élastase et agit contre les bactéries Gram positives et négatives. Elle peut agir en synergie avec une autre protéine des granules spécifiques, la lactoferrine, qui possède également sa propre activité anti-microbienne (Faurshou et Borregaard, 2003). Les lysozymes sont également impliqués dans l'action anti-microbienne, ainsi que les métalloprotéases connues par leurs rôles dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Faurshou et Borregaard, 2003).

c. Les granules gélatinases

Les gélatinases (tertiaires) sont formés au stade immature des neutrophiles. Ce sont des peroxydase-négatives mais contrairement aux granules spécifiques elles sont de petites tailles, leur rôle principal est d'entreposer les enzymes servant à la dégradation de la matrice extracellulaire, notamment la gélatinase, la collagénase et la leukolysine tout en étant une réserve de récepteurs membranaires utiles pour la diapédèse du neutrophile. Ces granules sont donc d'une grande importance pour une migration efficace vers le site inflammatoire. Elles

jouent aussi un rôle primordial dans l'explosion oxydative par leurs contenus en cytochrome *b558* (Faurischou et Borregaard, 2003).

d. Les vésicules sécrétoires

Se sont des granules à origine endocytotique, apparaissent plus tardivement vers la fin de la maturation des neutrophiles. Les granules sécrétoires sont les premières à être libérées en réponse à des stimuli inflammatoires, elles possèdent une variété de récepteurs membranaires nécessaires aux étapes précoces d'activation du neutrophile et à l'adhésion ferme sur l'endothélium activé, comme la $\beta 2$ -intégrine, le récepteur du fMLP, du LPS (CD14) et le récepteur Fc γ III. Ces granules renferment les métalloprotéases comme la leukolysine (Faurischou et Borregaard, 2003).

2.3.2. Mécanisme de dégranulation des neutrophiles

Les granules des neutrophiles sont mobilisées à différents moments de l'activation des neutrophiles et selon des stimulations hiérchisées. *In vitro*, suite à une activation par l'fMLP à l'ordre de nanomolaire la dégranulation est presque complète de tous types des granules sans spécificité, alors que la stimulation par les agonistes puissants tel que le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) mène à une forte dégranulation des granules à gélatinase, modérée pour les granules spécifiques et faible pour les granules azurophiles (Faurischou et Borregaard, 2003). L'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire représente le principal stimulant de la dégranularion du neutrophile. A l'exception des granules sécrétoires, il semble que chaque type de granules est secrété quand un certain nouveau seuil de calcium est dépassé (Ligeti et Mócsai, 1999). La dégranulation en réponse au calcium, semble être biphasique. Deux profils distincts de sécrétion sont observés, le premier est de haute affinité pour le calcium correspondant aux granules spécifiques et à gélatinase, le second profil est de basse affinité reflète la sécrétion des granules azurophiles (Rosales, 1997). Cette sensibilité différentielle des différents granules au calcium est attribuée aux variations de régulation des protéines annexines (Ligeti et Mócsai, 1999).

Les annexines (ANXs), forment un groupe de protéines comprenant des sites de liaison pour le calcium favorisant ainsi la fixation aux membranes plasmiques. Les interactions calcium dépendantes des annexines membranaires sont négociées par leur interaction avec les S100, une famille de petites protéines acides caractérisées par la présence de deux sites de fixation pour le calcium de type EF-hand (Donato, 2003). Il semble que c'est l'hétérogénéité des annexines qui détecte la sensibilité différentielle des granules au calcium. L'ANX A3 stimule la phase de haute affinité qui correspond plutôt à la sécrétion des granules

spécifiques ; alors que l'ANX A1 stimule la seconde phase de basse affinité qui correspond aux granules azurophiles (Rosales, 1997). En fin, de nombreuses autres annexines s'associent avec les phagosomes lorsque le neutrophile est activé.

Dans les neutrophiles, les annexines ne stimulent pas l'étape de fusion des vésicules agrégées, mais favorisent uniquement le rapprochement des membranes, soit en liant deux membranes simultanément, soit ce qui est plus probable en formant des multitétramères (Gerke et Moss, 2002).

Il est admis que la sécrétion des granules dans le neutrophile fait intervenir le modèle SNARE. Selon ce modèle, chaque vésicule de transport et chaque membrane cible contiennent un seul type de récepteur SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*), qui s'associe spécifiquement pour former un complexe stabilisé par le recrutement d'une ATPase soluble, NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive-factor*), par l'intermédiaire d'une SNAP (*Soluble NSF Attachment Protein*) (figure 5). Ce complexe serait responsable de l'accostage des granules. L'hydrolyse de l'ATP par le NSF induit un changement de conformation qui permettrait la fusion des membranes et la dissociation des SNAREs (Ligeti et Mócsai, 1999 ; Klenchin et Martin, 2000).

Dans les neutrophiles, l'intervention des SNAREs dans les processus de dégranulation permet d'expliquer la sécrétion régulée des quatre types des granules ainsi que sa cinétique. Les t-SNAREs représentés par la syntaxine-4 et-6 sont détectées exclusivement dans la membrane plasmique ; alors que les v-SNAREs comprenant le VAMP-2 (*Vesicle Associated Membrane Protein*) et SCAMP (*secretory carrier Membrane Protein*) sont présentes au niveau de la membrane des vésicules sécrétoires, les granules à gélatinase et les granules spécifiques. Les SNAP-23 et-25 (*synaptosomal associated protein of 23, 25 kDa*) sont trouvés principalement au niveau des membranes des granules azurophiles (Faurischou et Borregaard, 2003).

Les SNAREs pourraient intervenir dans le mécanisme de la fusion elle-même, en agissant comme une nanomachine. A la manière d'une "fermeture éclair", la fermeture progressive du complexe SNARE à partir des extrémités N-terminales des protéines (des extrémités cytoplasmiques) pourrait ainsi permettre de surmonter les forces de répulsions électrostatiques entre les membranes cellulaires et vésiculaires et de rapprocher les membranes jusqu'à ce que seulement quelques nanomètres les sépare (Melia *et al.* 2002). La fusion serait alors une conséquence purement mécanique du rapprochement induit par la mise en place progressive du complexe SNARE.

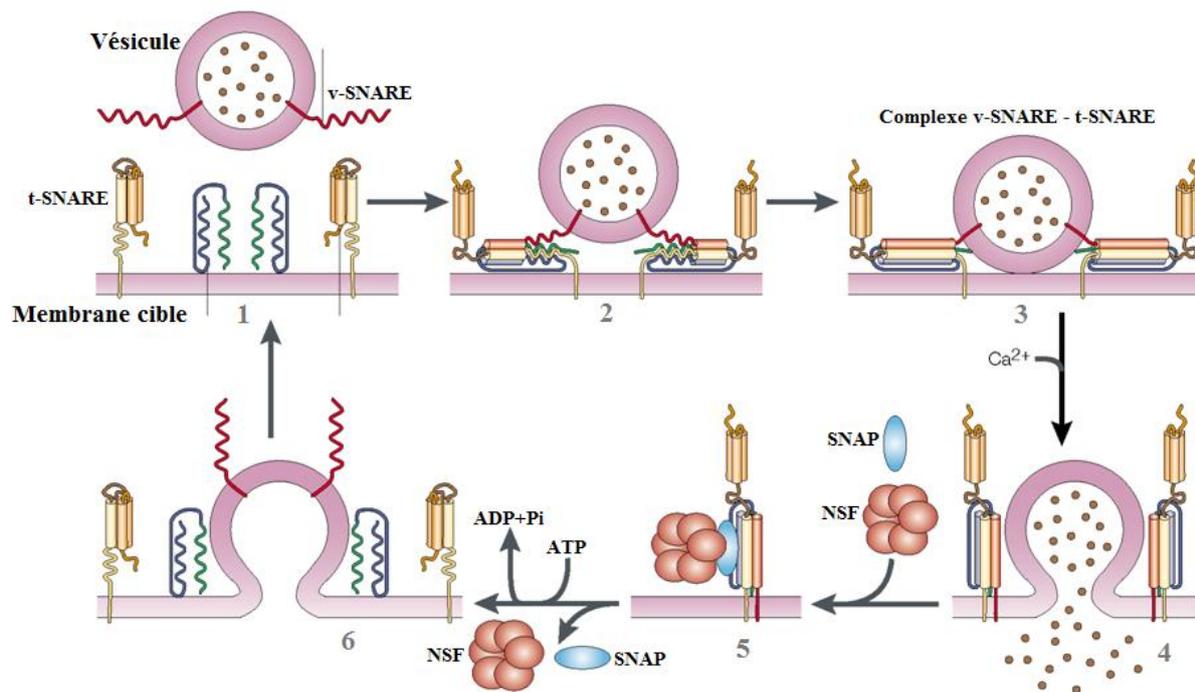


Figure 5: Modèle SNARE proposé pour expliquer la libération des granules du neutrophile. (1) Le v-SNARE reconnaît spécifiquement un t-SNARE présent sur la membrane plasmique. (2) L'assemblage des SNAREs permettrait (3) l'ancrage de la vésicule à la membrane puis (4) la fusion des deux membranes et la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

La fusion des membranes s'effectue en plusieurs étapes. D'après le modèle courant, le rapprochement des bicouches lipidiques de la membrane provoque d'abord la formation d'un pédoncule entre les monocouches lipidiques proximales (celles tournées vers le cytoplasme) (figure 6). L'extension progressive de ce pédoncule aboutit à un stade dit d'hémifusion dans lequel les monocouches proximales sont en continuité mais les monocouches distales restent disjointes. A ce stade, il n'y a donc pas encore d'échange entre l'intérieur de la vésicule et le milieu extracellulaire. Ces deux milieux n'entrent en communication qu'au moment de l'ouverture d'un pore de fusion, de nature lipidique, à travers les monocouches distales (Brunger, 2000).

Un mécanisme faisant intervenir un pore de nature protéique a également été suggéré par Mayer et ses collaborateurs (2002). Dans ce modèle, le complexe SNARE joue un rôle uniquement lors du rapprochement des deux membranes destinées à fusionner. Le pore de fusion est ensuite constitué par l'accolement en *trans* de deux secteurs V0 de l'ATPase vacuolaire. D'autres modèles proposent que la structure annulaire formée par les domaines

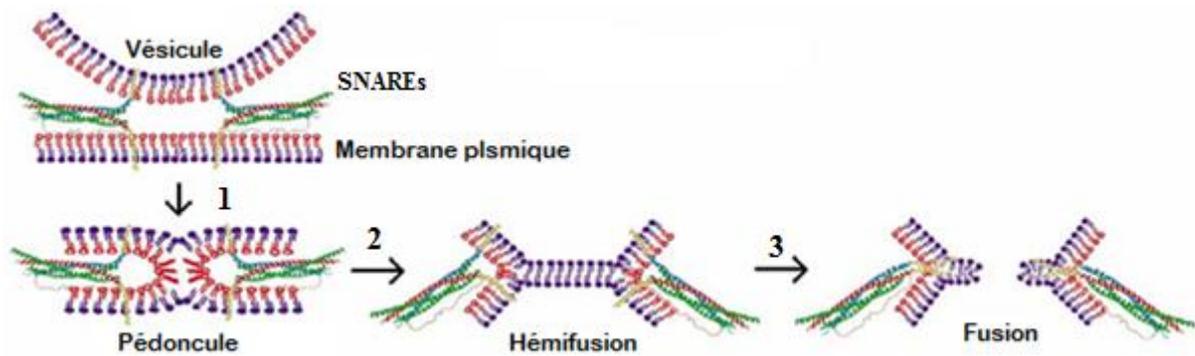


Figure 6: Rôle mécanique des SNAREs proposé dans le rapprochement des membranes vésiculaires et plasmiques. (1) Rapprochement des deux membranes et formation du pédoncule lipidique. (2) Hémifusion. (3) Formation d'un pore de fusion lipidique (Brunger, 2000).

transmembranaires des protéines du complexe SNARE constituent le pore de fusion (Han *et al.*, 2004).

2.4. L'explosion oxydative

A fin de détruire le corps étranger présent à l'intérieur du phagosome, les neutrophiles utilisent l'explosion oxydative, qui est définie par l'augmentation du métabolisme oxydatif des phagocytes à la suite de l'ingestion de particules et mène à la libération des espèces oxygénées réactives (ROS selon les anglo-saxons). L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide hypochloreux (HOCl) sont les espèces majoritaires produites lors de l'explosion oxydative (figure 7).

La NADPH oxydase, abondante dans les phagocytes et particulièrement les neutrophiles, est l'enzyme essentielle dans la production des ROS. Cette enzyme transfère les électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire pour former l' $O_2^{\bullet-}$ (Klebanoff, 2005).

Les anions superoxydes générés par la NADPH oxydase sont les précurseurs d'autres espèces oxygénées comme le peroxyde d'hydrogène et l'acide hypochloreux. L'anion $O_2^{\bullet-}$ est converti en H_2O_2 sous l'action du superoxyde dismutase (SOD).

Le H_2O_2 et le $\text{O}_2^{\bullet -}$ sont faiblement bactéricides comparativement au HOCl qui est l'arme majeure contre les micro-organismes. La MPO donne naissance au HOCl via l'oxydation de Cl^- par H_2O_2 .

Dans le phagosome cette forte concentration en espèces oxygénées réactives est toxique et mène à la destruction des micro-organismes. Si ces produits sont libérés de façon exagérée dans le milieu extracellulaire, ils peuvent engendrer des dommages tissulaires.

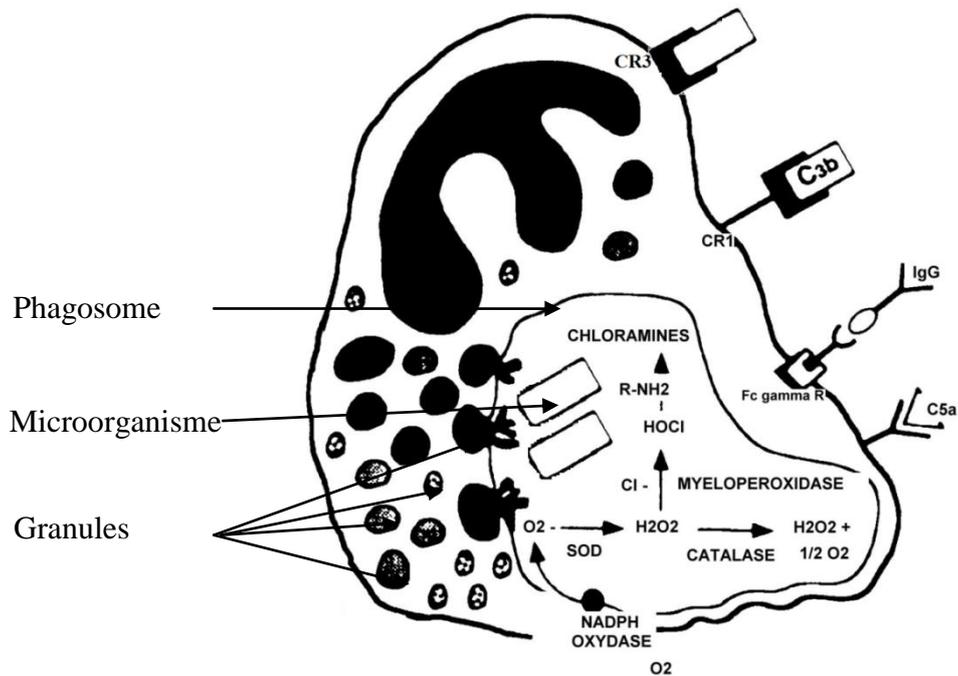


Figure 7: Production de différentes espèces réactives de l'oxygène par le neutrophile (Witko-Sarsat, 2000).

2.5. Libération des médiateurs

En plus de ses fonctions primaires, le neutrophile a aussi la capacité de sécréter une panoplie de médiateurs servant à communiquer avec les cellules environnantes. Étant souvent le premier impliqué dans la réaction inflammatoire, il peut contrôler la suite de la réponse immunitaire, influencer les cellules à proximité du site enflammé et amener d'autres leucocytes à migrer au site grâce à la production de médiateurs peptidiques et lipidiques.

2.5.1. Médiateurs peptidiques

Les cytokines sont de petites protéines glycosylées qui régulent divers phénomènes biologiques tels que l'hématopoïèse et la réaction inflammatoire. Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques (Rossi et Zlotnik, 2000 ; Zlotnik et Yoshie, 2000). Elles aident le déplacement des leucocytes vers les sites inflammatoires en induisant l'adhésion de ces cellules à l'endothélium et la matrice extracellulaire.

Les neutrophiles ont la capacité de synthétiser l'interleukine (IL)-1 et le TNF- α (Chakravarti *et al.*, 2007). Ce sont deux cytokines avec des effets pro-inflammatoires puissants qui affectent de nombreux types cellulaires. Le TNF- α et l'IL-1 induisent une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Elles provoquent aussi la production de chimiokines par les cellules endothéliales et les macrophages qui contribuent à l'influx de neutrophiles en augmentant leur adhésion et en les attirant au site lésé (Dinarello, 1996 ; Driscoll, 2000). De plus, le TNF- α et l'IL-1 potentialisent l'activité phagocytaire des neutrophiles, la dégranulation et l'explosion oxydative.

L'IL-8 est la chimiokine que les neutrophiles sécrètent en plus grande quantité (Cassatella *et al.*, 1992). Sa cible principale est le neutrophile. Elle induit leur migration dirigée mais aussi la dégranulation et l'explosion oxydative (Baggiolini *et al.*, 1992). L'IL-8 provoque une mobilisation du calcium intracellulaire et stimule l'adhésion des cellules par une augmentation de l'affinité des molécules d'adhésion (Paccaud *et al.*, 1990 ; Detmers *et al.*, 1990).

Les neutrophiles sécrètent aussi la chimiokine "macrophage inflammatory protein" (MIP)-1 α (Kasama *et al.*, 1994) qui agit sur une variété de types cellulaires. Elle induit la migration dirigée de ces cellules cibles mais elle module également la production de cytokines. Par exemple, les macrophages stimulés avec la MIP-1 α vont sécréter l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α (Menten *et al.*, 2002).

Les neutrophiles sont également une source de l'IL-12, l'IL-6, l'IL-3, "granulocyte/macrophage-colony stimulating factor" (GM-CSF), "granulocyte-colony

stimulating factor" (G-CSF), "monocyte/macrophage-colony stimulating factor" (M-CSF), d'interféron (IFN)- α , MIP-3 α , MIP-3 β et de "transforming growth factor" (TGF)- β (Chakravarti *et al.*, 2007).

2.5.2. Médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques sont des composés formés à partir des phospholipides membranaires. Les principaux médiateurs générés par les neutrophiles sont le PAF, le leucotriène (LT) B₄, la prostaglandine (PG) E₂ et le TX (thromboxane) A₂. Ces trois derniers sont des éicosanoïdes, ils sont issus du métabolisme de l'acide arachidonique (figure 8). L'acide arachidonique est libéré de la membrane par l'action de la phospholipase cytosolique A₂. Les neutrophiles produisent du PAF ancré à la membrane (Lynch et Henson, 1986) sauf sous certaines conditions où ils le libèrent dans le milieu (Sisson *et al.*, 1987 ; Miwa *et al.*, 1992). Le PAF est un facteur chimiotactique pour les neutrophiles. Il augmente l'adhésion et la motilité. Il induit aussi l'activation de la cellule et provoque la mobilisation de Ca²⁺ et la dégranulation des neutrophiles.

Le neutrophile est le plus grand producteur de LTB₄. Ce dernier a un effet vasodilatateur et augmente la perméabilité vasculaire. C'est un activateur efficace du neutrophile, il est un de ces puissants chimioattractants, il induit son adhésion aux cellules endothéliales (Palmer *et al.*, 1980).

La PGE₂ est également produite par les neutrophiles. Elle possède à la fois des fonctions pro-et anti-inflammatoires dépendamment des cellules et des récepteurs visés. Elle peut d'une part causer une vasodilatation et une exsudation importante. Elle peut également désactiver les monocytes et leur production de TNF- α et d'IL1- β . D'autre part, elle peut inhiber les fonctions inflammatoires du neutrophile telles que la production d'O₂⁻ et la chimiotaxie (James *et al.*, 2001).

Le neutrophile sécrète le TXA₂ qui a un effet pro-inflammatoire. Il entraîne l'activation et l'agrégation des plaquettes et la production de TNF- α et d'IL1- β chez les monocytes. En revanche, ce médiateur n'a pas d'effet sur les neutrophiles (James *et al.*, 2001).

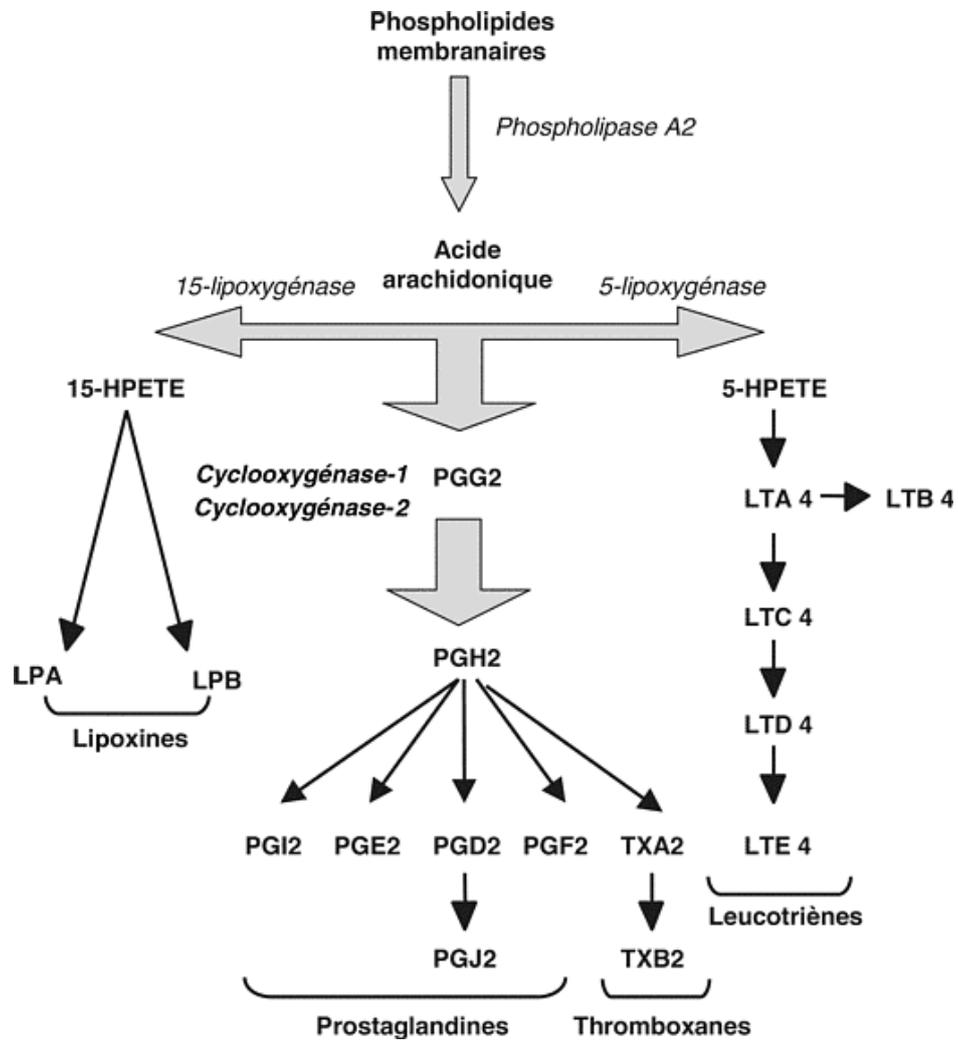


Figure 8 : Métabolisme de l'acide arachidonique. HPETE : acide hydroperoxyeicosatétraoïque ; LP : lipoxine ; LT : leucotriène ; PG : prostaglandine ; TX : thromboxane (Buecher *et al.*, 2001).

3. Transduction du signal dans le neutrophile

Suite à l'interaction des ligands avec leurs récepteurs, il y a transmission du signal à l'intérieur de la cellule conduisant à la formation de seconds messagers intracellulaires et l'activation de différentes réponses cellulaires (figure 9).

3.1. Voies d'activation par le formyl méthyl-leucyl-phénylalanine

Le tripeptide formylé ; formyl méthyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) est le principal facteur chemoattractant produit lors de la dégradation de *Escherichia coli*. Il se lie à des récepteurs de surface spécifiques aux formyl-peptides bactériens FPRs (formyl peptides receptors). Ces récepteurs régulent en aval le chimiotactisme, la dégranulation et l'activité oxydase. Les FPRs sont couplés à une protéine G. Après association du ligand fMLP, le récepteur subit un changement conformationnel qui permet son interaction avec la protéine G. Il se produit alors une conversion en GTP de la molécule GDP fixée au niveau de la sous-unité α de la protéine G. Cette conversion s'accompagne de la dissociation des sous-unités β et γ du récepteur qui sont les effecteurs de transduction du signal (Boulay *et al.*, 1990 ; Suzuki *et al.*, 1996 ; Lattin *et al.*, 2007). La sous-unité α libre interagit avec différents effecteurs comme la PLC, une famille d'enzymes catalyse l'hydrolyse calcium dépendant de la phosphatidyl inositol 4,5-diphosphate en diacyl glycerol (DAG) et en inositol 1, 4, 5 phosphate (IP3) (Rebecchi et Pentylala, 2000). Ces deux molécules jouent un rôle très important dans la transduction du signal, le IP3 est hydrosoluble, il diffuse dans le cytosol et induit la libération de Ca^{+2} du réticulum endoplasmique favorisant donc l'activation et la translocation de la protéine kinase C (PKC) vers la membrane (Cicchetti *et al.*, 2002). Dans les neutrophiles murins, la stimulation par l'fMLP active la PLC β_2 et β_3 , l'absence de ces isoformes dans les neutrophiles altère la production des espèces réactives de l'oxygène, mais sans avoir un effet notable sur le chimiotactisme des neutrophiles (Kölsch *et al.*, 2008). L'activation de la PLC est un événement précoce et transitoire qui est relayé par l'activation d'une PLD, cette enzyme catalyse l'hydrolyse de la phosphatidylcholine en acide phosphatidique et en choline. L'acide phosphatidique engendré est ensuite déphosphorylé par une phosphatase en DAG, qui active la PKC.

Azuma et ses collaborateurs (2007) ont proposé que dans les neutrophiles stimulés par l'fMLP, la PLD intervient dans l'activation des P38 MAPK qui à leur tour stimulent la production de superoxydes, mais pas le chimiotactisme. En revanche, Powner *et al* (2007) ont

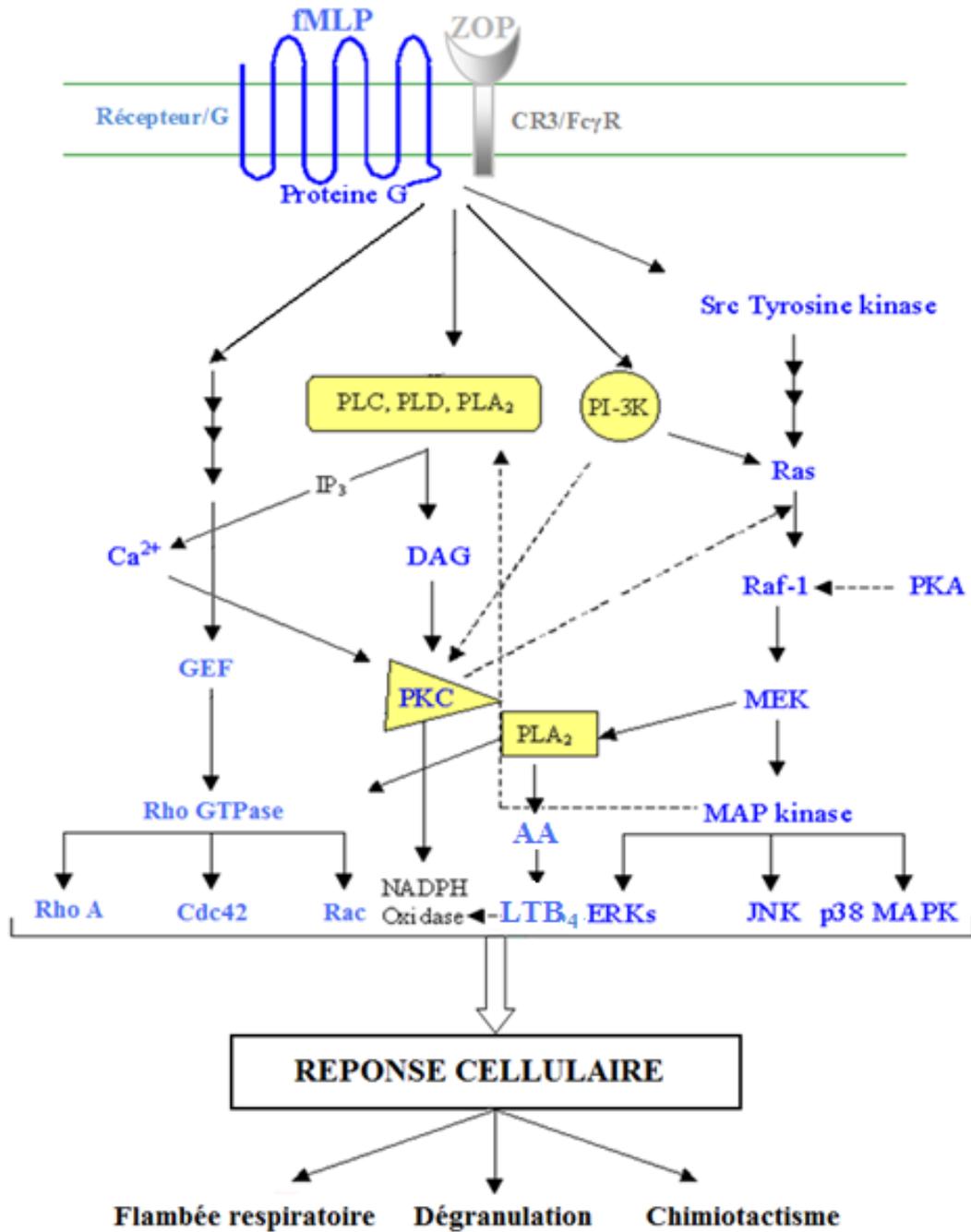


Figure 9: Voies de transduction du signal cellulaire, impliquées dans la réponse du neutrophile stimulé par le fMLP ou par le zymosan opsonisé (ZOP) (Hazan-Halevy *et al.*, 2000 ; Bouriche *et al.*, 2009).

démontré que la PLD intervienne également dans la régulation des intégrines. Plusieurs études ont rapporté que l'acide phosphatidique produit par la PLD stimule la génération de Phosphatidylinositol (4,5)-diphosphate (PtdIns(4,5) P2) par l'activation de la phosphatidylinositol 4-phosphatase 5-Kinase. Le PtdIns(4,5) P2 généré favorise alors la liaison de la talin aux intégrines (CD11b/CD18) induisant leur activation dont l'initiation de l'adhésion ferme des neutrophiles et leur migration (Kölsch *et al.*, 2008). Outre que le chimiotactisme, la PLD participe dans l'activation de la NADPH oxydase ainsi que la libération des granules intracellulaires au sein des neutrophiles activés par le fMLP, ce qui confirme l'implication de la PLD dans la signalisation qui régit ces processus. (Kaldi *et al.*, 2002).

Une autre phospholipase peut intervenir dans la transduction du signal dans les neutrophiles, la PLA₂. Dans les neutrophiles l'activation de la PLA₂ est requise suite à l'activation des récepteurs couplés à la protéine G et de la PKC. La PLA₂ pourrait être requise pour l'activation de la dégranulation et de la NADPH oxydase. La PLA₂ intervient dans le chimiotactisme en parallèle avec la voie de la PI 3-Kinase. Comme il a été suggéré que la PLA₂ participe dans la transduction du signal chimiotactique via leurs produits, tel que l'acide arachidonique (AA) et d'augmenter directement le flux de Ca⁺² (Kölsch *et al.*, 2008).

Suite à l'activation des différentes phospholipases, l'accumulation du calcium et du DAG entraînent l'activation des différentes isoformes de la PKC. Certaines isoformes de PKC sont impliquées dans l'activation et la régulation de la NADPH oxydase (Sergeant et McPhail, 1997), la dégranulation (Faurischou et Borregaard, 2003), l'adhésion intégrines dépendante (Laudanna *et al.*, 1998) et le chimiotactisme des neutrophiles (Dunzendorf et Wiedermann, 2000).

La PI3K est nécessaire dans les différentes réponses du neutrophile. En effet le traitement des PMNs stimulés par le fMLP par le wortmanin ou le LY294002, inhibiteurs spécifiques de la PI 3-kinase réduit la phosphorylation de la protéine p47^{phox} et abolit l'activation de NADPH oxydase, ainsi que la mobilisation des granules intracellulaires des neutrophiles. En outre, la PI3K est requise pour la migration dirigée des neutrophiles dans un gradient de peptides fMLP (Hannigan *et al.*, 2002). Au sein du neutrophile polarisé, le PtdIns (3,4,5)P3 représente une distribution également polarisée au front de migration où il favorise le recrutement des molécules protéiques impliquées dans le processus de polarisation des filaments d'actine (Cicchetti *et al.*, 2002 ; Kölsch *et al.*, 2008). Plus précisément, dans le neutrophile les produits de la PI 3-kinase semblent ne pas être nécessaires pour le processus de polymérisation de l'actine, mais ils sont indispensables pour une distribution adéquate de F-actine dans le pôle antérieur du neutrophile polarisé dont leur migration au sens du gradient

du chimioattractant. (Hannigan *et al.*, 2002 ; Moerlot et Firlet, 2003). A coté de son activité lipides kinase, la PI 3-kinase a une activité protéine kinase intrinsèque impliquée dans l'activation de certaines protéines telles que la PKC, les MAPK, la petite GTPase Ras (Kölsch *et al.*, 2008).

Il a été montré que le fMLP induit d'autres voies de transductions du signal aboutissant à l'activation des tyrosines kinase. L'activation des tyrosines kinases par différents agonistes (récepteurs membranaires des chimioattractants, Fc γ R) jouent un rôle important dans la modulation des fonctions du neutrophile. L'inhibition de l'activité tyrosine kinase affecte plusieurs réponses du neutrophile, la flambée respiratoire, la phagocytose, l'adhésion intégrine dépendante et la dégranulation (Ligeti et Mócsai, 1999).

Le fMLP provoquerait, également l'activation des Rho GTPase qui sont des régulateurs primordiaux dans de nombreux processus cellulaires, tels que l'activation du complexe NADPH oxydase, la mobilisation des granules intracellulaires, la phagocytose, le réarrangement du cytosquelette d'actine, la migration, la prolifération et l'adhésion cellulaire (Symons et Settleman, 2000).

Les Rho GTPases, sont connus comme étant d'importants régulateurs de la polarisation et de la motilité du neutrophile (Cicchetti *et al.*, 2002). En effet, l'activation de la protéine Cdc42 permet la formation de protrusions comme les microvillosités et les filopodes et la polarisation cellulaire dans le sens du gradient de chimioattractants (Allen *et al.*, 1998). Elle aurait aussi un rôle dans le nombre et la stabilité des lamellipodes et dans la localisation et la stabilité du PI(3,4,5)P₃ au niveau du front de migration (Srinivasan *et al.*, 2003). L'activation de Cdc42 serait responsable de la relaxation de la conformation auto-inhibitrice de la protéine WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*), une protéine à domaines multiples qui est un activateur du complexe de nucléation Arp2/3 (Samstag *et al.*, 2003). La protéine Rac est requise à l'avant de la cellule pour permettre la polymérisation du cytosquelette d'actine et pour induire la formation des protrusions membranaires tels que les lamellipodes, la formation des complexes d'adhésion liés aux intégrines (Gu *et al.*, 2003). La protéine Rho est requise pour permettre d'induire les forces de rétraction et de contraction au niveau de la queue de rétraction des neutrophiles et des monocytes. RhoA permet notamment l'activation de la Rho kinase qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine et inhibe la phosphatase MLCP (*Myosin Light Chain Phosphatase*). La phosphorylation de la MLCP permet l'activation de la myosine ATPase et la contraction actine/myosine (Raftopoulou et Hall, 2004).

La voie des MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), est également activée par la protéine G. Se sont des serine/ thréonine kinases regroupés en trois familles : *Extracellular signal-Regulated Kinases* (ERK1/2), c-Jun-N-terminal protein kinases (JNKs) et les P38 MAP kinases (Rao, 2001). Les MAPK sont impliqués dans le remodelage du cytosquelette, l'activation de la phospholipase A₂ ainsi que l'activation de NADPH oxydase (Downy *et al.*, 1998).

3.2. Voies d'activation par le zymosan opsonisé

Le zymosan est un extrait de *Saccharomyces cerevisiae*, phagocyté par les neutrophiles quand il est préalablement opsonisé par le sérum. Le zymosan opsonisé stimule simultanément les récepteurs du complément (CR) et des immunoglobulines (FcγR) (Sergeant et McPhail, 1997).

L'ingestion de particules recouvertes d'immunoglobulines G (IgG) est réalisée grâce à l'aggrégation de récepteurs FcγRII et la phosphorylation de leurs motifs cytoplasmiques ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) via des tyrosine kinases. Les ITAMs phosphorylés servent de sites d'ancrage des Src tyrosine kinases, qui déclenche diverses voies de signalisation (Nauclicr *et al.*, 2002). Les récepteurs de zymosan opsonisé par le sérum mis en cause une activation des différentes phospholipases PLC, PLD et PLA2 avec d'importantes productions d'acide arachidonique, de diacyl glycérol, d'acide phosphatidique et autres métabolites lipidiques (Meshulam *et al.*, 1988, Della Bianca *et al.*, 1991 ; Hazan *et al.*, 1997). Les PKCs sont également activées par le zymosan opsonisé et subissent une redistribution au niveau du phagosome (Sergeant et McPhail, 1997). Les MAPKs ERK1/2 et les p38 MAP kinases sont également activés par le zymosan opsonisé (Hazan-Halevy *et al.*, 2000).

4. Dysfonctionnement du neutrophile

Le neutrophile est une cellule destructrice possédant plusieurs moyens de protéger l'organisme. D'ailleurs, des défaillances majeures des fonctions primaires de cette cellule entraînent la plupart du temps des infections répétées et/ou graves, systémiques, parfois mortelles. D'un autre côté, il arrive que le neutrophile cause des dommages aux tissus sains lors d'une activation prolongée, d'une accumulation exagérée et non nécessaire, d'une suractivation ou d'un dérèglement qui retourne l'attaque contre l'organisme, comme dans l'ischémie, la goutte, l'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies inflammatoires aiguës ou

chroniques. Des mécanismes de contrôle rigoureux doivent donc exister au sein de l'organisme pour limiter l'activation des neutrophiles.

5. Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont classés en deux catégories, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens.

5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) forment un groupe hétérogène de substances qui agissent sur les produits de la réaction inflammatoire quelle que soit son origine. Se sont des inhibiteurs non sélectifs des cyclooxygénases.

Les cyclooxygénases (COX) notamment le COX-1 régulent plusieurs fonctions physiologiques dans l'organisme comme l'intégrité de la muqueuse gastrique, la fonction rénale et l'agrégation plaquettaire (Vonkeman *et al.*, 2008). Le fait que les AINS ciblent les différentes isoformes des cyclooxygénases sans sélectivité, plusieurs effets indésirables vont accompagner leur usage. Des recherches sont réalisées pour développer des inhibiteurs sélectifs des COX ayant un rôle plus au moins restreints dans la réponse inflammatoire, comme COX-2 (Bressan et Tonussi, 2008).

5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de substances dérivées du cortisol qui agissent à différents niveaux de la réaction inflammatoire. Les corticoïdes agissent sur de nombreux métabolismes et fonctions de l'organisme. Ils augmentent la production de la lipocortine (protéine anti-inflammatoire) inhibant ainsi la phospholipase A2 donc la libération de l'acide arachidonique. Par contre ils diminuent fortement la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation et la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les cytokines, les ions superoxydes.

L'usage des AIS est associé à de nombreux effets indésirables tels que les troubles gastro-intestinales, l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse des glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003).

5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Plusieurs plantes médicinales sont utilisées traditionnellement pour traiter ou soulager certaines maladies inflammatoires telles que la goutte, l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, l'arthrose, l'eczéma et la rhinite allergique (tableau 2).

Plusieurs investigations *in vitro* et *in vivo* ont rapportées que les propriétés anti-inflammatoires de ces plantes revient à leur contenu en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les triterpénoïdes, les stérols, les tannins, les alcaloïdes, les sesquiterpénoïdes, les curcumines, les coumarines, les composés phénoliques, les caroténoïdes, les vitamines (A, E et C), les huiles essentielles et les polysaccharides (Setty et sigal, 2005 ; Iwalewa *et al.*, 2007).

En général, le mécanisme d'action des ces métabolites secondaires est dû à leur action sur plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, l'activation de facteurs moléculaires kappa B (NF- κ B) et la génération des espèces réactives de l'oxygène (Iwalewa *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes ont un rôle important dans le traitement de l'inflammation, ils exhibent des activités anti-inflammatoires similaires à celles des AINS mais sans avoir des effets indésirables de type ulcérogène (Ghedira, 2005). Plusieurs flavonoïdes affectent la fonction de certaines enzymes impliquées dans le processus inflammatoire, notamment les tyrosines et les serines-thréonine protéines kinases, qui sont impliquées dans la transduction du signal et l'activation des cellules inflammatoires (Iwalewa *et al.*, 2007). Plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique, soit par l'inhibition des cyclo-oxygénases ou par l'inhibition des lipo-oxygénases.

Plusieurs études ont rapportées que certaines plantes médicinales exercent leurs effets anti-inflammatoires en inhibant l'activation de facteurs NF- κ B. C'est un facteur de transcription qui induit l'expression de différents gènes, y compris les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. A l'état inactif, le NF- κ B se trouve dans le cytosol séquestré par le I κ -B (inhibiteur I kappa-B). Suite à une activation cellulaire par différents stimulus (PLS, cytokines, ROS), le I κ -B est phosphorylé puis dissocié de NF- κ B. Le NF- κ B libre migre alors vers le noyau et induit la transcription des différents gènes, parmi eux, ceux qui codent pour les cytokines et les chimiokines inflammatoires tel que IL1, IL2, IL6, IL8, le TNF, des molécules d'adhésion et la cyclooxygénase 2 (Riehemann *et al.*, 1998). L'effet inhibiteur de

Tableau 2: Certaines plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires (Breneton, 1993 ; Girre, 2001 ; Setty et Sigal, 2005)

Nom scientifique	Nom commun	Famille	Partie utilisée	Composition	Utilisation
<i>Chamaemelum nobile</i>	Camomèle, Camomille romaine	<i>Asteraceae</i>	Fleurs	Lactones sesquiterpéniques, huiles essentielles, acides phénols, coumarines, flavonoïdes.	Antiallergique, analgésique.
<i>Calendula officinalis</i>	Calendula Souci	<i>Asteraceae</i>	Feuilles Fleurs	Huiles essentielles, caroténoïdes, flavonoïdes, terpènes, acides phénoliques.	Inflammations cutanées, antalgique
<i>Origanum glandulosum</i>	Origan	<i>Lamiaceae</i>	Feuilles Sommités fleuries	Huiles essentielles, tannins, flavonoïdes, acides phénoliques.	Asthme, maux de gorges et de dents, rhumatisme.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin	<i>Lamiaceae</i>	Feuilles Sommités fleuries	Huiles essentielles, flavonoïdes, tannins, acides phénoliques, diterpènes.	Asthme, analgésique.
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus	<i>Myrtacées</i>	Feuilles	Huiles essentielles, terpènes, tanins, flavonoïdes.	Analgésique, rhume, maux de gorge, douleurs articulaires inflammatoires
<i>Urtica dioica</i>	Ortie	<i>Urticaceae</i>	Parties aériennes Racines	Caroténoïdes, vitamine A, B, C et E, glucoprotéine, polysaccharides, stérols, composés phénoliques.	Antiallergique, eczéma, douleurs rhumatismales.
<i>Marrubium vulgare</i>	Marrube blanc	<i>Lamiaceae</i>	Sommités fleuries	Lactones diterpéniques, mucilage, pectine alcaloïdes, sels minéraux, huiles essentielles, flavonoïdes, tannins	Fièvre, rhumatisme, inflammation de la gorge, grippe.
<i>Zingiber officinalis</i>	Gingembre	<i>Zingiberaceae</i>	Rhizome	Anthocyanines, huiles essentielles, sesquiterpéniques, gingérol, amidon, protéines, lipides.	Arthrose, migraines, douleurs rhumatismales.

NF- κ B est attribué aux polyphénols et au curcumines. En effet, ces métabolites secondaires empêche la dégradation protéolytique de l'inhibiteur I Kappa-B (Iwalewa *et al.*, 2007).

L'effet des flavonoïdes sur le système immunitaire est complexe et demeure encore mal élucidé. Certains d'entre eux réduisent l'activation du complément, diminuant de façon générale la réponse inflammatoire. À doses élevées, ils inhibent les fonctions lymphocytaires, mais à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés. L'activité immuno-modulatrice des flavonoïdes dépend, d'une part, de leur capacité à inhiber la formation des éicosanoïdes et de l'histamine et de leur pouvoir piègeur des radicaux libres d'autre part (Ghedira, 2005).

A coté des flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins jouent un rôle primordial dans la résolution de l'inflammation. Les anthocyanes inhibent les enzymes protéolytiques de dégradation du collagène (élastase, collagénase), ce qui explique leurs propriétés vasoprotectrices et anti-œdémateuses. Les anthocyanes sont considérés comme molécules anti-inflammatoires car ils bloquent la production du NO à partir des polynucléaires neutrophiles au cours de la phase précoce de l'inflammation (Derbel et Ghedira, 2005).

En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables de réduire les dommages tissulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène et de limiter les conséquences de différentes maladies inflammatoires. Il a été prouvé que la quercétrine et d'autres flavonoïdes ont un effet inhibiteur puissant sur la myéloperoxidase, la NADH Oxydase, la xanthine oxydase et la NO synthase indicible (Middleton *et al.*, 2000). Les tanins sont doués d'un pouvoir antioxydant et inhibent les activités enzymatiques de la protéine-kinase C et de la 5-lipoxygénase (Derbel et Ghedira, 2005). En effet, la majorité de ces métabolites exhibent une activité anti-inflammatoire via leur activités anti-oxydantes (Iwalewa *et al.*, 2007).

6. La plante *Capparis spinosa* L.

Capparis spinosa L., est une plante de la famille des *Capparidaceae* communément appelée le câprier le Kabbar en Algérie. C'est un petit arbuste épineux, prostré, largement répandu dans le bassin méditerranéen, et dans les milieux secs le long du littoral d'Europe, d'Afrique du nord sur le partout du bassin méditerranéen jusqu'au sud de l'Asie et dans l'Australie. Le câprier est traditionnellement employé pour des raisons pharmacologiques, comme il est utilisé en cuisine méditerranéenne diverses préparations.

6.1. Classification de la plante *Capparis spinosa* L.

Sous-règne : *Ttracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Dilleniidae*

Ordre : *Capparales*

Famille : *Capparidaceae*

Genre : *Capparis*

Espèce : *Capparis spinosa*

6.2. Aspect botanique de *Capparis spinosa*

Capparis spinosa, est un arbrisseau dressant avec des tiges flexueuses, épineuses portant des feuilles alternes, pétiolées, ovales-arrondies, lisses, vertes, et souvent un peu rougeâtre, avec des épines à la base (figure 10). Les fleurs sont axillaires, solitaires, composées de quatre grands sépales verts et de quatre pétales blancs veinés de rose et de nombreuses étamines très longues et d'un étrange pistil, très long qui sort de la fleur. Le fruit est ovoïdes oblong, rougeâtre, s'ouvre à la fin de la maturité. Les graines sont noire, matée, lisses en forme de rein de 3 mm de longueur (Satyanarayana *et al.*, 2008).

6.3. Composition chimique de la plante

Plusieurs études phytochimiques ont montré que *Capparis spinosa* comporte une amalgame de composés actifs dans ses diverses parties.

Les polyphénols et les flavonoïdes sont également présent dans le câprier (Panicoa *et al.*, 2005 ; Satyanarayana *et al.*, 2008). Il a été montré que les bourgeons floraux du câprier renferment les flavonoïdes suivants : la quercétine, la rutine, la quercétine-3-rutinosides, la quercétine-7-O-glucorhamnoside, le kaempférole-3-rutinosides, le kaempférole 3-O-rhamnosyl-rutinoside (Inocencio *et al.*, 2000, Bonina *et al.*, 2002 ; Satyanarayana *et al.*, 2008). La partie aérienne de la plante contient aussi la quercétine 3-O-glucoside, la quercétine 3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, la quercétine 3-O-[6''-α-L-rhamnosyl-6''-β-D-glucosyl]-β-D-glucoside et la quercétine-7-O-D-glucopyranoside-β-L-rhamnopyranoside (Satyanarayana *et al.*, 2008). Le câprier est également riche en acides hydroxycinnamiques y compris l'acide caféique, l'acide férulique, acide p-coumarique et l'acide cinnamique (Panicoa *et al.*, 2005 ; Satyanarayana *et al.*, 2008). Des composés homologues aux composés polyphénoliques en



Figure 10: Photographies de la plante *Capparis spinosa*. (A) Aspect général de la plante. (B) Les feuilles, la fleur et les fruits. (C) Les câpres (bourgeons floraux).

particulier : le cappaprenole-12, le cappaprenole-13 et le cappaprenole-14 ont été isolés de la plante (Satyanarayana *et al.*, 2008).

Les alcaloïdes sont aussi présents dans le câprier, ils sont distribués principalement dans les racines et les graines (Panicoa *et al.*, 2005 ; Satyanarayana *et al.*, 2008). La teneur élevée en alcaloïdes a été trouvée dans les racines de la plante où la stachydrine représente 87,43 % des alcaloïdes totaux. Trois alcaloïdes spermidines (la capparispine, la capparispine-26-O- β -D-glucoside et la cadabicine 26-O- β -D-glucoside hydrochloride) ont été identifiés dans les racines de la plante (Fu *et al.*, 2008). La cadadicine, un nouvel alcaloïde a été isolé du câprier (Satyanarayana *et al.*, 2008).

Romeo et ses collaborateurs (2007) ont identifiés environ 145 composés volatiles dans le câprier. Les aldéhydes (22.2%) et les esters (21%) représentent les classes chimiques les plus abondantes dans la plante. Les feuilles du câprier renferment principalement les isothiocyanates, les n-alkanes, les terpenoïdes, les phenyl propanoïdes, les aldéhydes, et les acides gras. Les principaux composants de cette huile sont le thymol (26.4%), l'isothiocyanate d'isopropyle (11%), les 2-hexenal (10.2%) et l'isothiocyanate butylate (6.3%). Les composés volatils des fruits mûrs et des racines de la plante sont présentés principalement par le méthyle isothiocyanate, l'isopropyle isothiocyanate et le sec-butyl isothiocyanate (Satyanarayana *et al.*, 2008).

Le glucocapperine (90%) représente le glucosinolate majeure des bourgeons floraux du câprier (Panicoa *et al.*, 2005). D'autres glucosinolates comme la sinigrine, la glucoiberine et la glucocleomine ont été également isolées à partir des graines et des feuilles de la plante. En outre, les mêmes auteurs ont rapporté que les indoles glucosinates comme le glucobrassicine, le neoglucobrassicine et le 4-methoxyglucobrassicine sont présents dans les racines de la plante (Satyanarayana *et al.*, 2008).

Des triterpenoïdes (α -amyrin), des stérols, des saponines et des faibles quantités de la vitamine E, de β -carotène et de la vitamine C ont été détectées dans la plante (Tesoriere *et al.*, 2007 ; Satyanarayana *et al.*, 2008).

En plus, les câpres contiennent quelques composés minéraux tels que le sodium, le potassium et le phosphore (Giuffrida *et al.*, 2002 ; Özcan et Aydın, 2004). Les grains du câprier contiennent aussi des protéines, des lipides et des fibres (Jiang *et al.*, 2007).

6.4. Usage traditionnelle du câprier

Le câprier est utilisé depuis l'antiquité dans plusieurs pays soit en cuisine, soit en médecine folklorique. En effet, les câpres sont généralement utilisées en cuisine méditerranéenne comme épice, apéritive avec les olives et le fromage ou comme complément à la viande, aux salades, aux pâtes, et à d'autres nourritures. Indépendamment de son utilisation comme condiments, le câprier a été utilisé depuis des siècles dans la phytothérapie traditionnelle, comme antifongique (Ali-Shtayeh et Abu Ghdeib, 1999 ; Lemhadri *et al.*, 2007), antileishmaniose (Jacobson et Schlein, 1999 ; Lemhadri *et al.*, 2007), antihépatotoxique (Gadgoli et Mishra, 1999), anti-inflammatoire (Satyanarayana *et al.*, 2008), anti-hyperlipidémique et hypoglycémiant (Eddouks *et al.*, 2005). Les câpres sont connues dans différents pays méditerranéens pour leurs propriétés curatives, expectorantes, diurétiques, anti-hypertensives, cataplasmiques et toniques (Satyanarayana *et al.*, 2008).

6.5. Activités biologiques du câprier

Le câprier est doué de plusieurs activités biologiques. Il est connu comme un agent analgésique, antirhumatismale, comme il est impliqué dans le traitement de la goutte. Panicoa et ses collaborateurs (2005) ont montré que l'extrait méthanolique des bourgeons floraux du câprier représente un effet protecteur sur les chondrocytes via leur activité inhibitrice sur la production des prostaglandines, le monoxyde d'azote et des espèces réactives de l'oxygène qui provoquent la biodégradation du cartilage. Satyanarayana et ses collaborateurs (2008) ont rapporté que le câprier possède un effet anti-inflammatoire, du fait que, le capparénole-13 isolé à partir du câprier a inhibé considérablement l'œdème de l'oreille des rats induit par la carragénane. Trombette et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que l'extrait méthanolique des bourgeons floraux présente un effet antihistaminique et antiallergique.

Les substances naturelles extraites du câprier sont également d'importants agents antioxydants. En effet, l'extrait méthanolique des bourgeons floraux cru de la plante a montré une activité antioxydante dans divers modèles *in vitro*, d'où il est suggéré leur utilisation potentielle dans les conditions pathologiques du stress oxydant (Tesoriere *et al.*, 2007). En outre, le même extrait *in vitro*, a montré une forte activité antioxydante et un grand pouvoir antiradicalaire et même une application locale de cet extrait protège la peau contre les érythèmes provoqués par les rayons UV (Bonina *et al.*, 2002).

L'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante est utilisé pour le traitement des douleurs hépatiques (Handa *et al.*, 1986). En effet, cet extrait est largement utilisé pour déterminer l'activité antihépatotoxique de différents constituants de la plante. L'acide

benzoïque p-méthyl, isolé de la fraction méthanolique de l'extrait aqueux a montré une activité antihépatotoxique significative (Gadgoli et Mishra, 1999).

L'extrait aqueux de la plante a révélé, *in vivo*, une activité anti-hyperglycémiant sans affecter la concentration sanguine de l'insuline. En effet, l'administration orale de l'extrait aqueux de la plante, 20 mg/kg pendant 14 jours, a produit une diminution significative du taux de glucose sanguin chez les rats diabétiques. Le taux du glucose sanguin a été presque normalisé après 2 semaines d'administration orale et d'une façon quotidienne de 20 mg/kg de l'extrait aqueux de câprier. En plus, ce traitement provoque ainsi une diminution de taux plasmatique des triglycérides après 1 à 2 semaines et du cholestérol après 4 à 7 jours (Eddouks *et al*, 2005 ; Lemhadri *et al.*, 2007).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans la présente étude : héparinate de lithium, dextran , histopaque[®]- 1077, Hanks Balanced Salt Solution sans Ca^{2+} et Mg^{2+} (HBSS₁) ou avec Ca^{2+} et Mg^{2+} (HBSS₂), acide N-[2-Hydroxyethyl]Piprasine-N'-[2-ethanesulfanique] (HEPES), ovalbumine, formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP), cytochalasine B (CB), N-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-p-Nitroanilide, 1-Methyl-2-Pyrrolidinone, zymosan sont de grade analytique et proviennent de Sigma (Allemagne). Les solvants et les autres produits utilisés sont aussi de grade analytique et proviennent de Fluka (Allemagne) et Prolabo (France).

1. 2. Matériel biologique

1.2.1. Sang humain

Le sang humain est obtenu fraîchement par prélèvement veineux au pli du coude des volontaires sains, non fumeurs ayant certifié n'être sous aucune médication de toutes sorte au moins durant les derniers 15 jours qui ont précédé le prélèvement.

1.2.2. Matériel végétal

La plante *Capparis spinosa* ; le câprier (Kebbar) a été récoltée en juin 2008 de la région d'Ouled N'sar wilaya de Béjaia. Après son identification par Dr. Laouar H (Laboratoire de Botanique, Université de Sétif), les échantillons ont été nettoyés puis séchés à l'ombre et à température ambiante. La matière sèche est ensuite broyée et conservée jusqu'à l'extraction.

2. Méthodes

2.1. Préparation des solutions de travail

* Héparinate de lithium (50 U/ ml), préparé dans du NaCl 0.9 %. La solution est répartie en aliquotes de 1 ml et gardée à -32°C.

* Dextran 10%, préparé dans du NaCl 0.9 %. La solution est répartie en aliquotes de 2 ml et gardée à -32°C.

* Hanks Balanced Salt Solution sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (HBSS₁) (0.95%), ou avec Ca^{2+} et Mg^{2+} (HBSS₂) (0.95%), préparé dans l'eau distillée fraîche. Le pH de la solution est ajusté à 7.4 avec du NaOH 0.1N.

* Solution tampon PBS (50 mM), préparée en mélangeant progressivement la solution de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mM) à la solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mM) jusqu'à l'obtention d'un pH égale à 7.4. Le mélange obtenu est ensuite supplémenté par du NaCl (150 mM).

* Tampon HEPES 0.1M, préparée dans NaCl 0.5 M. Le pH est ajusté à 7.4 avec du NaOH 0.1N.

* Ovalbumine (0.25%), préparé dans la solution de HBSS₂.

* Bleu de Trypan (0.4 %), préparé dans du NaCl 0.9 %.

* Solution Turk, préparée on mélangeant 1 ml de violet de gentiane à 1 ml d'acide acétique, puis complétée jusqu'à 100ml par de l'eau distillée.

* fMLP (10^{-2} M), préparé dans du DMSO. La solution est répartie en aliquotes de 10 μl et gardée à -32°C .

* Cytochalasine B (2 mM), préparé dans du DMSO. La solution est répartie en aliquotes de 20 μl et gardée à -32°C .

* Substrat d'élastase : N-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-p-Nitroanilide (250 mM), préparé dans 1-Methyl-2-Pyrrolidinone, la solution est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

* Le zymosan opsonisé est préparé selon la méthode de Borelli et ses collaborateurs (2002) et Sergeant et Mcphail (1997) avec certaines modifications. Une solution de zymosan (10 mg) suspendue dans 1.25 ml de NaCl 0.9% est bouillie (100°C) dans un bain marie pendant 20 min, Puis centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min à 4°C , le culot est récupéré et incubé en présence de 500 μl de sérum humain à 37°C pendant 20 min, puis une centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min à 4°C suivie d'une série de lavages du culot récupéré par le HBSS₁ sont effectuées. En fin, le culot est récupéré dans le HBSS₁ à une concentration finale de 20 mg/ml. La solution est aliquotée et gardée à -32°C .

2.2. Extraction

2.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique de *Capparis spinosa*

L'extraction par le méthanol est effectuée selon la méthode décrite par Steenkamp et ses collaborateurs (2004). Pour cela, 10 g de matériel végétal (feuilles et bourgeons floraux) sont macérés dans 100 ml de méthanol 80 % (méthanol/eau, V/V) à température ambiante pendant 24 heures et sous agitation. Après filtration, le filtrat est soumis à une évaporation

dans un rotavapor (Büchi) à 40°C. L'extrait obtenu est ensuite lyophilisé (lyophilisateur Phywe chrisa) pendant 12 heures. Le lyophilisat est pesé et le rendement est calculé.

2.2.2. Préparation de l'extrait aqueux de *Capparis spinosa*

L'extrait aqueux est préparé selon la méthode décrite par Steenkamp et ses collaborateurs (2004). Pour cela, 10g de matériel végétal (feuilles et bourgeons floraux) sont bouillies pendant 15 minutes dans 100 ml d'eau distillée. Après centrifugation à 2000 rpm pendant 10 min, le surnageant est filtré puis lyophilisé, et le rendement est calculé.

2.3. Préparation des neutrophiles humains

2.3.1. Isolement des neutrophiles humains

Les neutrophiles sont isolés selon la méthode adaptée par Bouriche et ses collaborateurs (2003). Le sang est prélevé sur héparinate de lithium (5 U/ml). Pour accélérer la vitesse de sédimentation des hématies, 2 ml de dextran 10 % sont ajoutés à 10 ml de sang. Après une heure de sédimentation à température ambiante, le plasma est récupéré dans un tube conique en polypropylène au fond du quel on injecte 2 ml d'histopaque®- 1077. Une fois centrifugé à 1000 rpm pendant 25 min à 4°C (Rotina R 35 Germany), le culot contenant les polynucléaires neutrophiles est récupéré puis soumis à une série d'hémolyse des hématies résiduelles par l'addition de 1 ml de l'eau distillée fraîche et froide pendant 30 seconde. Pour stopper l'hémolyse, 5 ml de HBSS₁ fraîches sont ajoutés. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 1000 rpm pendant 10 min à 4°C. L'étape de la lyse hypotonique est répétée jusqu'à l'obtention d'un culot exempt de toutes traces d'hématies contaminantes. A la fin de la dernière centrifugation les neutrophiles sont suspendus dans l'HBSS₁ et conservés dans un bain de glace (figure 11). Lors de son utilisation la suspension cellulaire est recentrifugée à 1000 rpm pendant 10 min à 4°C et récupéré dans le HBSS₂ ou dans HBSS₂ contenant l'ovalbumine 0.25 %.

2.3.2. Comptage des neutrophiles

Le nombre de neutrophiles obtenus à la fin de l'isolement est déterminé par comptage sur une cellule de Thoma. Pour cela, 50 µl de la suspension cellulaire sont mélangés à 450 µl de la solution Turk. Une goutte de la suspension colorée est ensuite déposée contre une lamelle montée sur la cellule de Thoma. Les neutrophiles sont comptés dans les 16 carreaux de la cellule à l'aide d'un microscope (Ziess, Germany) avec l'objectif X10. La concentration cellulaire est estimée par la formule suivante :

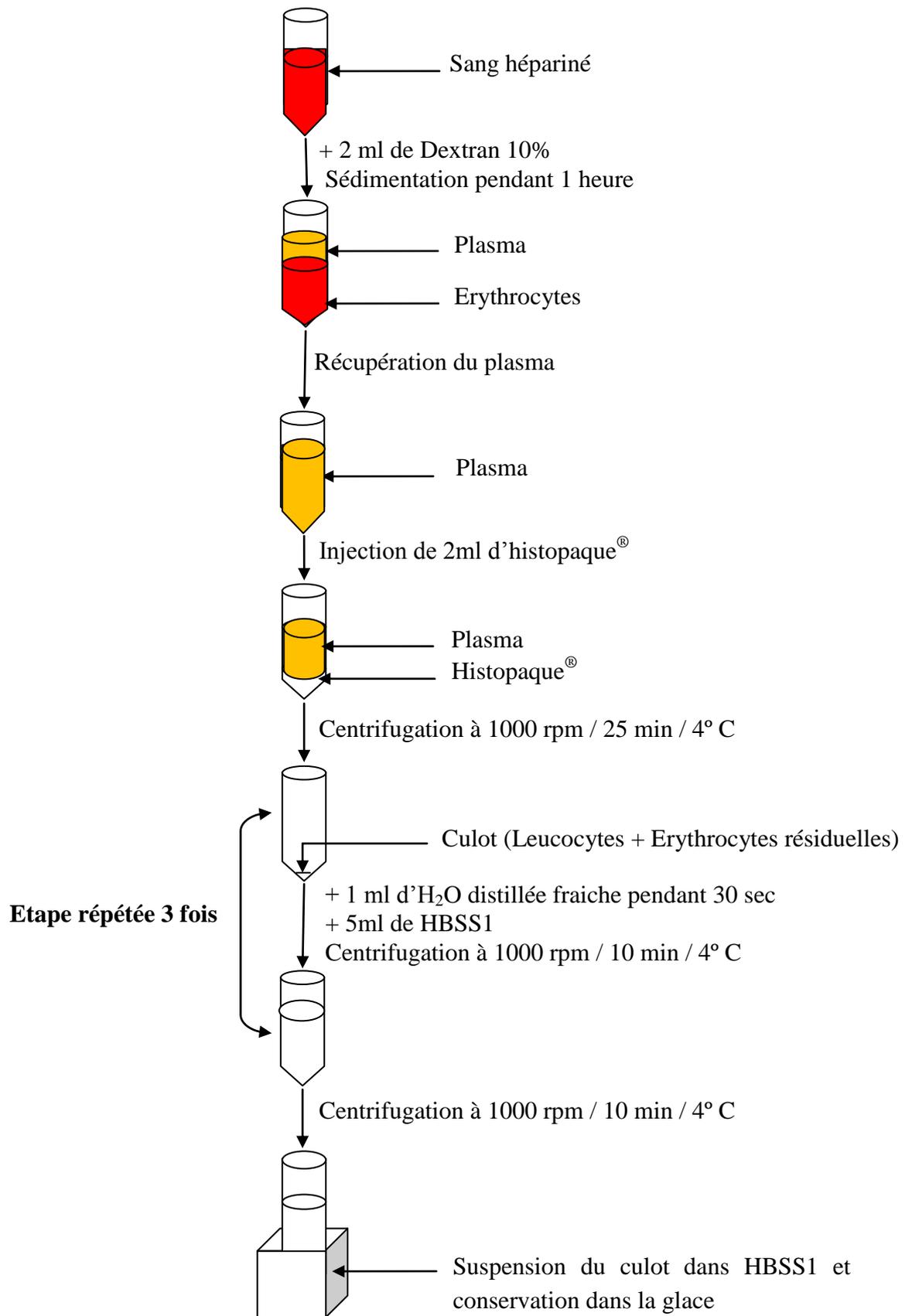


Figure 11: Principales étapes d'isolement des neutrophiles à partir du sang humain.

$$[C] = N \times 10 \times 10^4$$

- * [C] : La concentration cellulaire (cellule/ml).
- * N : Le nombre de cellules comptées dans les 16 carreaux.
- * 10 : Le facteur de dilution.
- * 10⁴ : Facteur spécifique de la cellule de Thoma, utilisé pour obtenir le nombre de cellules dans un volume égale à un millimètre.

2.3.3. Viabilité des neutrophiles isolés

La viabilité des neutrophiles est évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Pour cela, 250 µl de la suspension cellulaire (3 x 10⁶ cellules/ ml) sont incubées en présence de 250 µl de la solution de bleu de Trypan (0.4%) pendant 10 min à 37°C. Après comptage sur une cellule de Thoma à l'aide d'un objectif de X100 d'un microscope les cellules non viables (colorées en bleu à cause de leur internalisation de bleu de Trypan) et les cellules viables (non colorées à cause de leurs membranes actives qui excluent le bleu de Trypan) sont comptées et la viabilité cellulaire est déterminée selon la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = [(N_T - N_{NV}) / N_T] \times 100$$

- * N_T : Nombre total de cellules comptées (viable et non viable).
- * N_{NV} : Nombre de cellules non viables.

2.3.4. Pureté des neutrophiles isolés

La pureté de la suspension cellulaire est évaluée par réalisation d'un frottis en étalant une goutte de la suspension cellulaire sur une lame en verre. Après être fixer par le méthanol pendant 5 min, une coloration par le Wright Stain est menue pendant 2 min. le frottis est ensuite observé au microscope à l'aide d'un objectif X40. La pureté de la suspension cellulaire est alors établie comme étant le pourcentage de neutrophiles sur les 100 cellules comptées aléatoirement dans le frottis.

2.4. Evaluation de la cytotoxicité des substances testées

La cytotoxicité des extraits testés dans la présente étude est évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Pour cela, 250 µl de la suspension des neutrophiles (3 x 10⁶ cellules/ ml) sont incubés en présence de différentes concentrations de l'extrait méthanolique et aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier et en présence de 100 µM de la rutine ou de la quercétine à 37°C pendant 30 min. Puis un volume équivalent de la solution de

bleu de Trypan (0.4%) est ajouté, après 10 min d'incubation à 37°C le pourcentage de viabilité cellulaire est estimé comme précédemment décrit.

2.5. Evaluation de l'activité de l'élastase

La dégranulation est étudiée par mesure de l'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles. Cette activité est évaluée selon la méthode de Bieth et ses collaborateurs (1974). L'effet des différentes substances testées sur cette activité est évalué dans un premier lieu. Pour cela les neutrophiles (5.5×10^6 cellules/ml) sont incubés pendant 15 min à 37°C dans HBSS₂ en présence de l'agent stimulant ; l'fMLP (10^{-6} M) supplémenté par la cytochalasine B (10^{-5} M). Après centrifugation (15 min à 3000 rpm), 75 µl de surnageant sont incubés 10 min à 37°C dans les puits d'une plaque de microtitration en absence et en présence de différentes concentrations de l'extrait méthanolique des bourgeons floraux et des feuilles du câprier (25-500 mg/ml) ou de l'extrait aqueux des deux parties de la plante (10-50 mg/ml) ainsi qu'en présence de 25 µM de la rutine ou de la quercétine. Ensuite 75 µl de substrat spécifique de l'élastase (N-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-p-Nitroanilide, 10^{-4} M) préparé dans le méthyle 2-pyrulidone et dilué dans le tampon HEPS 0.1M sont ajoutés. La plaque est réincubée à 37°C pendant 25 min. L'activité de l'élastase est déterminée par mesure de l'absorbance de p-nitroanilide libéré dans le milieu à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Stat Fax 2100, USA). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité de l'élastase par rapport au contrôle sans extraits ou substances testées considérées comme le 100 % d'activité.

2.6. Effet des extraits du câprier sur la dégranulation

La dégranulation des neutrophiles est activée par deux types de stimulants, l'fMLP et le zymosan opsonisé. Dans un premier temps, les neutrophiles (5.5×10^6 cellules/ml) suspendus dans le HBSS₂ sont incubés (10 min à 37°C) en présence de différentes concentrations des extraits méthanoliques des bourgeons floraux et des feuilles du câprier (25-100 µg/ml) ou des extraits aqueux des deux parties de la plante (10-50 µg/ml) préparés dans le HBSS₂ et en présence de 25 µM de la rutine ou de la quercétine. Les neutrophiles sont ensuite stimulés par l'addition de l'un des deux stimulants ; 25 µl d'fMLP (10^{-6} M) supplémenté par 12.5 µl de cytochalasine B (10^{-5} M) ou de 7 µl de zymosan opsonisé (0,5 mg / ml) et incubés à 37°C pendant 15 min dans le cas de la stimulation par l'fMLP et 50 min dans le cas d'activation par le zymosan opsonisé. Après une centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min à 4°C, l'activité de l'élastase libérée est déterminée par mesure de l'absorbance de p-

nitoanilide libéré ainsi après avoir ajouter 75 µl de substrat spécifique de l'élastase [(N-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-p-Nitroanilide),(10⁻⁴ M)] au 75 µl de surnageant prédéposé dans les puits de la plaque de microtitration. L'absorbance de p-nitroanilide libéré dans le milieu est mesurée à 405 nm en utilisant un lecteur de microplaque contre les puits contrôles. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de dégranulation des neutrophiles exercé par les extraits et les flavonols testés (rutine et quercétine) en fonction de leur concentration par rapport au contrôle.

2.7. Effet des extraits du câprier sur le chimiotactisme

Le test de chimiotactisme est étudié à l'aide d'une chambre de chimiotactisme (48-micro well chemotaxis chamber de Neuro, Probe, Inc., USA). La chambre est composée de deux compartiments superposables, chacun à 48 puits distribués sur 12 rangées verticales de 4 puits chacune (figure 12). Le compartiment inférieur est réservé pour l'agent chimioattractant, tandis que le compartiment supérieur est réservé à la suspension cellulaire. Les deux compartiments sont séparés par le silicone gasket qui a la même distribution en puits que les compartiments de la chambre.

Le chimiotactisme des neutrophiles est réalisé selon la méthode de Falk et ses collaborateurs (1980) et adaptée par Bouriche (2005). Les neutrophiles (1.5 x 10⁶ cellules/ml) sont incubés dans le HBSS₂ contenant 0.25% d'ovalbumine en présence de différentes concentrations de l'extrait méthanolique et aqueux des bourgeons floraux ou des feuilles du câprier (50 - 300 µg /ml), de la rutine, de la quercétine et de l'aspirine à 100 µM pendant 10 min à 37°C. Durant l'incubation, dans les puits du compartiment inférieur de la chambre de chimiotactisme, les puits contrôles positifs et tests sont remplis avec 27 µl d'agent chimioattractant ; fMLP (10⁻⁷ M). Tandis que les puits réservés pour les contrôles négatifs sont remplis par le HBSS₂ contenant l'ovalbumine uniquement. Un filtre de polycarbonate comportant des pores de 5 µm de diamètre est ensuite déposé soigneusement sur les puits de compartiment inférieur. Pour chasser les bulles d'air formées, le silicone gasket est appliqué. Après avoir fixé le compartiment supérieur déposé contre le compartiment inférieur, 45 µl de la suspension cellulaire préincubée en absence des substances testées sont déposées dans les puits correspondants aux puits contrôles positifs et négatifs, par contre les puits tests sont remplis par la suspension cellulaire des neutrophiles préincubés en présence de différentes concentrations des substances testées. Après incubation dans un milieu humide et riche en CO₂ à 37 °C, le filtre est retiré et sa face qui était en contact avec la suspension cellulaire est lavée par le tampon phosphate, puis fixé dans le méthanol pendant 5 min et coloré par le



Figure 12: Photographie de la chambre de chimiotactisme (48-micro well chemotaxis chamber). La chambre est composée de deux compartiments inférieur et supérieur superposables, séparés par le silicone gasket.

Wright Stain. La lecture au microscope du filtre est effectuée à l'aide d'un objectif X100 (Zeiss, Germany) par comptage des neutrophiles dans cinq champs choisis aléatoirement dans les puits. La moyenne générale des neutrophiles comptés dans trois puits est considérée comme le résultat final après soustraction le nombre des neutrophiles comptés dans les puits contrôles négatifs pour avoir le nombre des neutrophiles ayant réellement migré sous l'action du chimioattractant. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la migration des neutrophiles par rapport au contrôle selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [(N_C - N_T) / N_C] \times 100$$

N_C : La moyenne du nombre de cellules comptées dans les puits contrôles.

N_T : La moyenne du nombre de cellules comptées dans les puits tests.

3. Analyse statistique

Les résultats des différents essais réalisés sont exprimés comme étant la moyenne d'au moins trois répétitions. La signification statistique entre le contrôle et les échantillons traités est déterminée par le test t de Student et les différences sont considérées significatives au seuil de 5% ($p < 0,05$).

RÉSULTATS

RESULTATS

1. Préparation des extraits de *Capparis spinosa*

L'extraction méthanolique et aqueuse à partir de la matière sèche du câprier, montre que l'extrait aqueux représente le rendement le plus élevé de 20% pour les deux parties ; la partie des bourgeons floraux et la partie des feuilles en comparaison avec l'extrait méthanolique qui est de l'ordre de 10 % pour les deux parties de la plante.

2. Préparation des neutrophiles humains

La méthode suivie pour l'isolement des neutrophiles a permis d'obtenir jusqu'à 3 millions de cellules par ml de sang. L'efficacité de cette méthode est vérifiée par la viabilité ainsi que par la pureté de la suspension cellulaire. La viabilité des cellules isolées a été estimée à plus de 95% dont plus de 90% sont des neutrophiles.

3. Effet Cytotoxique des extraits du câprier

La cytotoxicité des substances utilisées envers les neutrophiles a été évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. L'incubation des neutrophiles avec l'extrait méthanolique et aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier (jusqu'à 500 µg/ml), avec la rutine (100 µM), la quercétine (100 µM) et le DMSO (1%) pendant 30 min a donné une viabilité supérieure à 95%, sans enregistrer aucune différence significative par rapport au contrôle (figure 13). Ces résultats montrent l'absence de tout effet cytotoxique des extraits utilisés envers les neutrophiles humains, du moins aux concentrations utilisées dans ce travail. Il est donc exclu que tout effet inhibiteur de ces extraits soit dû à leur cytotoxicité.

4. Etude de la dégranulation des neutrophiles humains

Afin d'évaluer l'effet des extraits du câprier sur la dégranulation des neutrophiles humains, nous avons exploité l'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles humains activés soit par le fMLP/CB, soit par le zymasan opsonisé comme marqueur de la dégranulation. L'activité de l'élastase libérée par exocytose des neutrophiles est évaluée par mesure de l'absorbance de la p-nitroanilide produit par l'action de l'élastase sur son substrat spécifique (N-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-p-Nitroanilide) à 405 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la dégranulation en fonction de différentes concentrations des extraits testés par rapport au contrôle considéré comme le 100%.

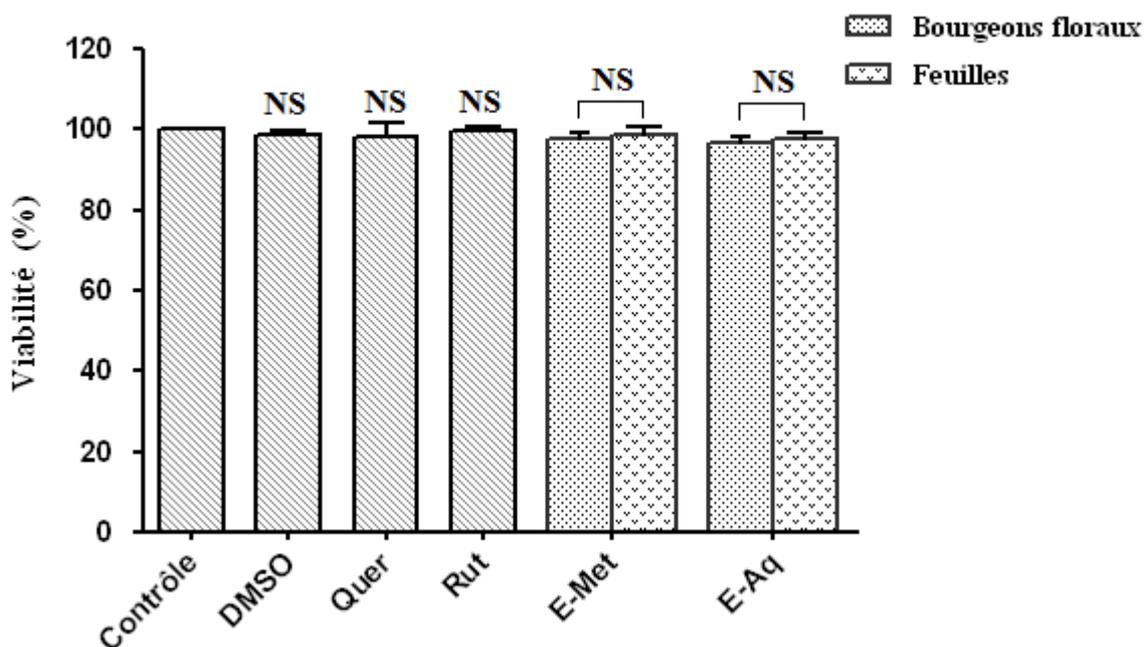


Figure 13: Cytotoxicité des extraits du câprier et des différentes substances utilisées sur les neutrophiles. La cytotoxicité de l'extrait méthanolique (E-Met) et aqueux (E-Aq) des bourgeons floraux et des feuilles (500 µg/ml), de la rutine (Rut, 100µM), de la quercétine (Quer, 100µM) et du DMSO (1%) est évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Les PMNs (3×10^6 cellules/ml) sont incubés pendant 30 min en présence de ces substances à 37°C. La viabilité des PMNs est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (sans substances testées) considéré comme le 100% de viabilité. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle; NS : non significatif (test t de Student).

4.1. Effet des extraits du câprier sur l'activité de l'élastase

Tant que la dégranulation des neutrophiles humains est déterminée dans la présente étude par mesure de l'activité de l'élastase libéré par les neutrophiles, il est indispensable dans un premier temps d'évaluer l'effet des différentes substances étudiées sur cette activité. Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique des bourgeons floraux et des feuilles du câprier (jusqu'à 100 µg/ml) et l'extrait aqueux des deux parties de la plante (jusqu'à 50 µg/ml), n'exercent aucun effet inhibiteur sur l'activité de l'élastase des neutrophiles humains du moins jusqu'aux concentrations maximale utilisées. La rutine et la quercétine (25µM) utilisées pour la comparaison ne montrent aucun effet inhibiteur sur l'activité de l'élastase. Le phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) utilisé comme inhibiteur spécifique des protéases avec une concentration finale de 10 mM exerce un effet inhibiteur de 95% (figure 14).

La pré-incubation des PMNs en présence de 125 - 500µg/ml de l'extrait méthanolique des bourgeons floraux et des feuilles du câprier a révélé que ces deux extraits inhibent significativement ($p < 0,05$) et d'une manière concentration-dépendante l'activité de l'élastase. A 500 µg/ml cette inhibition atteint le taux de 49% \pm 3.28 % pour l'extrait des bourgeons floraux et 59.41% \pm 3.49% pour l'extrait des feuilles (figure 15).

4.2. Effet des extraits du câprier sur la dégranulation

L'effet des différentes substances testées sur la dégranulation des neutrophiles est évalué par mesure de l'activité d'élastase libéré par ces neutrophiles activés soit par l'fMLP/CB, ou par le zymosan opsonisé.

Les résultats obtenus montrent que les neutrophiles activés par le fMLP/CB induisent une forte dégranulation. Cette dégranulation est plus rapide et plus importante que celle induite par le zymosan opsonisé (figure 16).

4.2.1. Effet des extraits méthanoliques du câprier sur la dégranulation

Le traitement des neutrophiles avec différentes concentrations des extraits méthanoliques des bourgeons floraux et des feuilles du câprier (25 - 100 µg/ml) a réduit significativement ($p < 0,05$) la dégranulation des PMNs induite par l'fMLP/CB ainsi que par le zymosan opsonisé. Les inhibitions obtenues dépendent de la concentration des extraits. Les résultats montrent que l'inhibition exercée par l'extrait méthanolique des bourgeons floraux et des feuilles est similaire dans les deux cas de stimulus (figure 17).

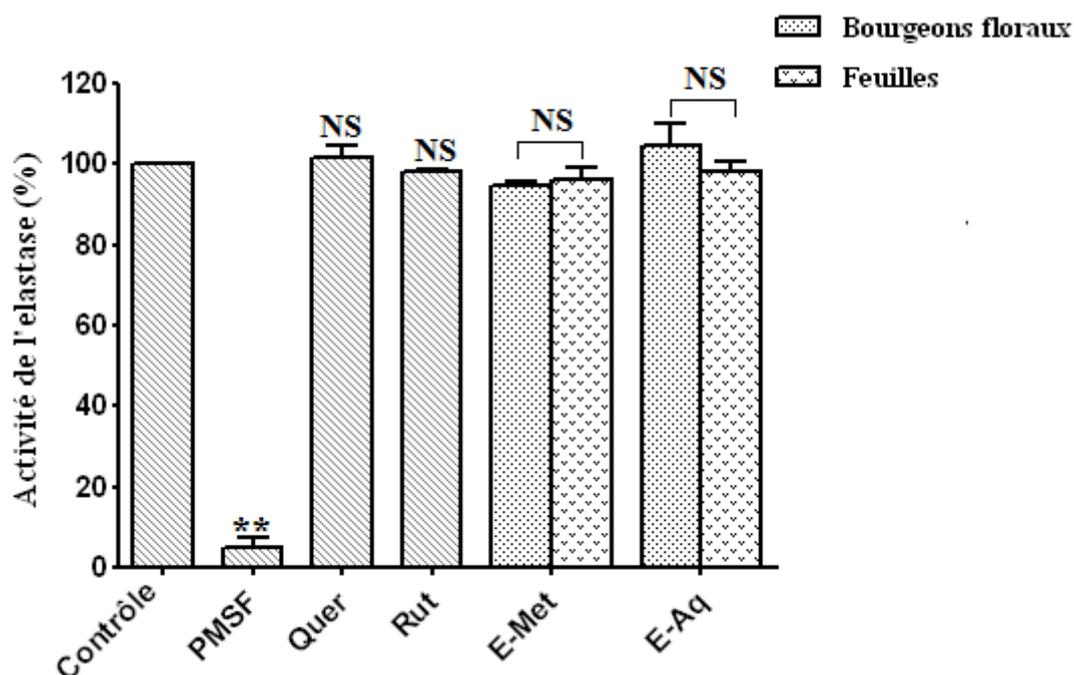


Figure 14: Effet des extraits du câprier et des autres substances utilisées sur l'activité de l'élastase. Le surnageant contenant l'élastase libérée par les PMNs ($5,5 \times 10^6$ cellules/ml) stimulés est incubé avec l'extrait méthanolique des bourgeons floraux et des feuilles (E-Met, $100 \mu\text{g/ml}$), l'extrait aqueux (E-Aq, $50 \mu\text{g/ml}$) des deux parties de la plante, la rutine (Rut, $25 \mu\text{M}$) et la quercétine (Quer, $25 \mu\text{M}$) pendant 10 min à 37°C . Après l'addition du N-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-p-Nitroanilide (10^{-4} M), l'activité de l'élastase est détectée par mesure de l'absorbance de p-nitroanilide libéré dans le milieu à 405 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité de l'élastase par rapport au contrôle (sans substance testée) considéré comme le 100% d'activité. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; NS : non significatif ; $**p < 0.01$ (test t de Student).

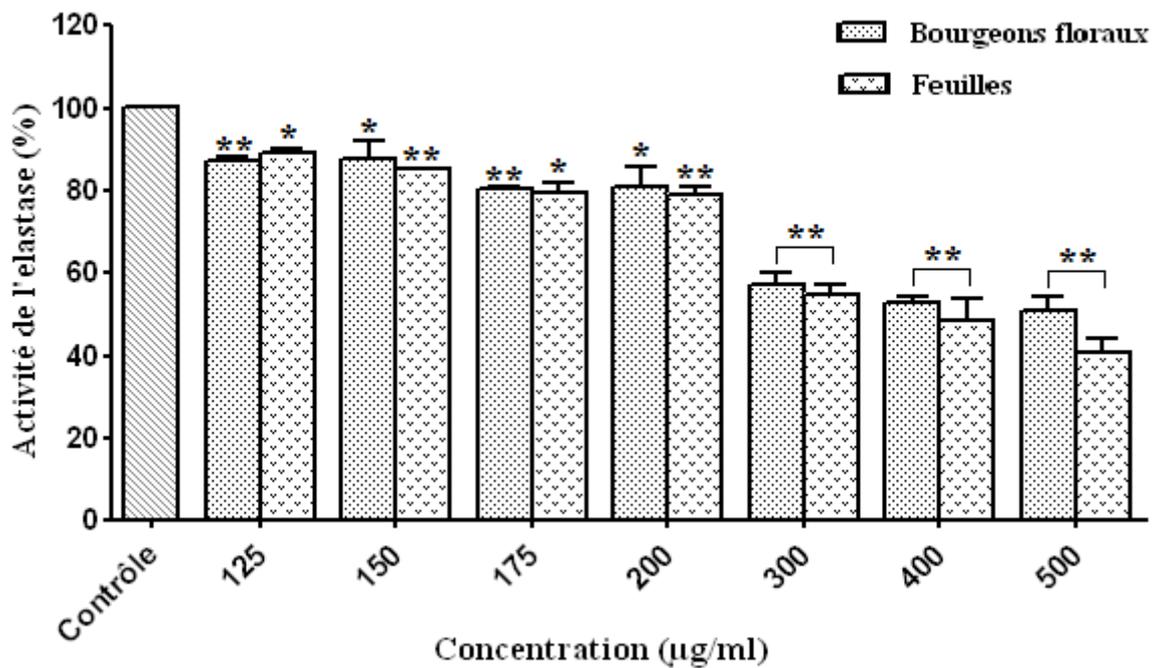


Figure 15: Effet inhibiteur des extraits méthanoliques du câprier sur l'activité de l'elastase des neutrophiles humains. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles citées dans la figure 13. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité de l'élastase par rapport au contrôle considéré comme le 100% d'activité. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test t de Student).

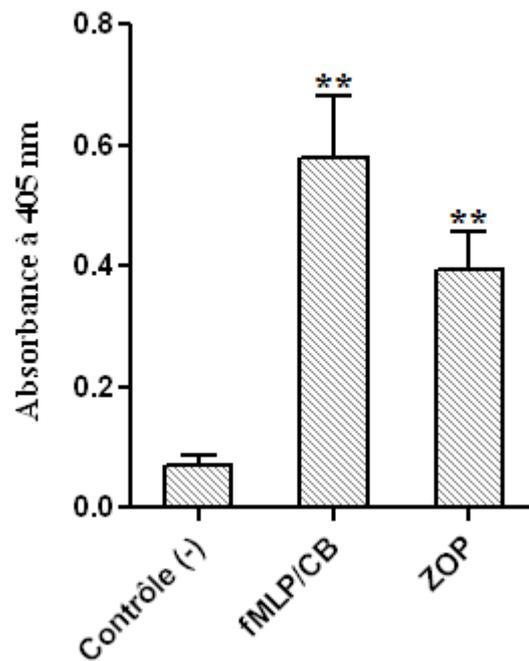


Figure 16: Activation de la dégranulation des PMNs par le fMLP/CB et par le zymosan opsonisé. Les neutrophiles (5.5×10^6 cellules/ml) sont incubés à 37°C pendant 15 min en présence de l’fMLP/CB (10^{-6}M / 10^{-5}M) ou du zymosan opsonisé (ZOP, $0,5\ \mu\text{g/ml}$) pendant 50 min. Après l’addition du substrat de l’élastase (10^{-4}M), l’activité de l’élastase est détectée par mesure de l’absorbance de p-nitroanilide libéré dans le milieu à 405 nm. Les résultats sont exprimés en absorbance à 405 nm. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; ** $p < 0.01$ (test t de Student).

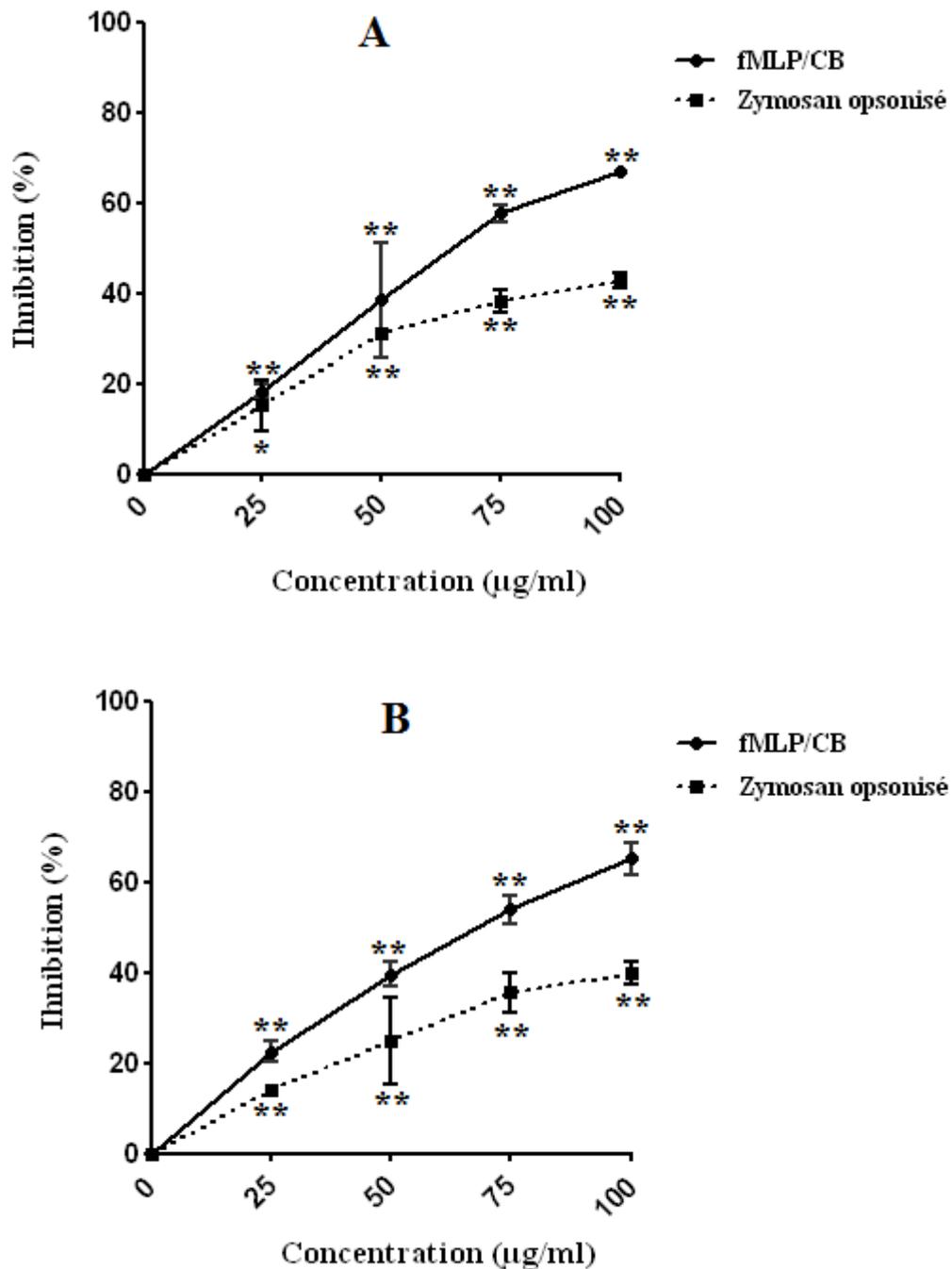


Figure 17: Effet des extraits méthanoliques des bourgeons floraux(A) et des feuilles (B) du câprier sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l’fMLP/CB ou par le zymosan opsonisé. Les neutrophiles (5.5×10^6 cellules/ml) sont pré-incubés à 37°C pendant 10 min en présence de différentes concentrations de l’extrait méthanolique (25 - 100 µg/ml), puis activés par l’fMLP/CB ($10^{-6}\text{M}/10^{-5}\text{M}$) ou par le zymosan opsonisé (0,5 mg/ml). Après centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min à 4°C , l’activité de l’élastase libérée est mesurée. Les résultats sont exprimés en pourcentage d’inhibition de la dégranulation des neutrophiles par rapport au contrôle considéré comme le 100% d’activité. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test t de Student).

L'activité inhibitrice des extraits méthanoliques sur les neutrophiles activés par le fMLP/CB est plus importante que celles exercée sur les neutrophiles activés par le zymosan opsonisé. Dans le cas de la stimulation par l'fMLP/CB l'extrait méthanolique des feuilles et des bourgeons à 100 µg/ml a engendré une inhibition de 65% et 67% respectivement. Par contre dans le cas de la stimulation par le zymosan opsonisé et à la même concentration, les deux extraits ont induit une inhibition de 40% et 43% pour les extraits des feuilles et des bourgeons respectivement (figure 18).

La concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀) est de 69,58 µg/ml pour l'extrait méthanolique des bourgeons floraux, et de 70,98 µg/ml pour l'extrait méthanolique des feuilles dans le cas de la stimulation par l'fMLP/CB.

4.2.2. Effet des extraits aqueux du câprier sur la dégranulation

Le prétraitement des neutrophiles par différentes concentrations de l'extrait aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier (10 à 50 µg/ml) inhibe légèrement la dégranulation des neutrophiles fMLP/CB stimulés. Cette inhibition atteint 20% pour les deux extraits à 10 µg/ml et reste constante même à fortes concentrations. Par contre dans le cas de l'activation des neutrophiles par le zymosan opsonisé les extraits aqueux n'ont aucun effet significatif sur la dégranulation des neutrophiles (figure 19).

L'incubation des neutrophiles avec 25 µM de la rutine et de la quercétine (flavonols utilisés pour la comparaison) a inhibé considérablement la dégranulation des neutrophiles stimulés par fMLP/CB. Cette inhibition est de 53,56% ± 9,7% pour la rutine et 59,49% ± 7,6% pour la quercétine (figure 20).

Comme la figure 20 le montre, l'extrait méthanolique des feuilles et des bourgeons a un pouvoir inhibiteur plus fort que celui de l'extrait aqueux et proche de celui de la rutine et de la quercétine (25 µM).

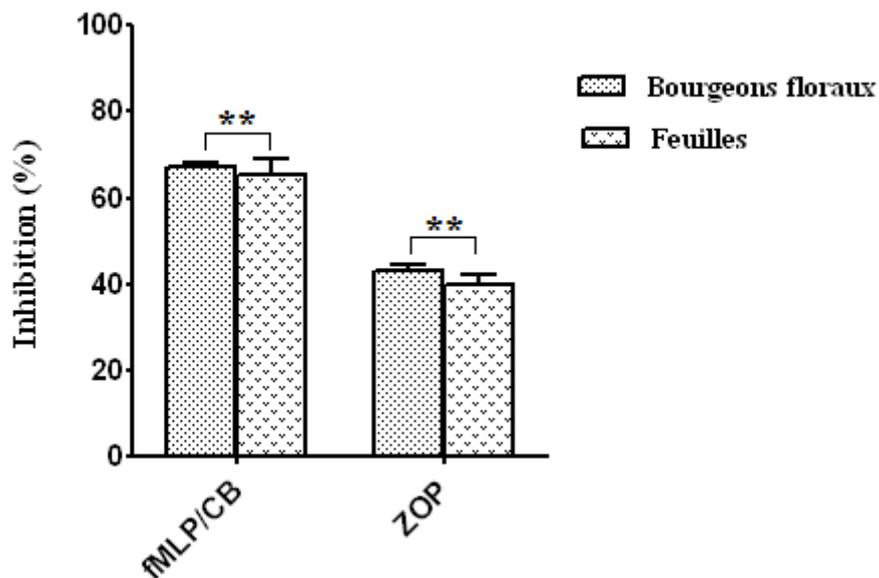


Figure 18: Effets des extraits méthanoliques du câprier sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l’fMLP/CB ou par le zymosan opsonisé (ZOP). Les neutrophiles (5.5×10^6 cellules/ml) sont pré-incubés à 37°C pendant 10 min en présence de $100 \mu\text{g/ml}$ des extraits méthanoliques. Les résultats sont exprimés en pourcentage d’inhibition de la dégranulation des neutrophiles par rapport au contrôle considéré comme le 100% d’activité. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SD. Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; $**p < 0.01$ (test t de Student).

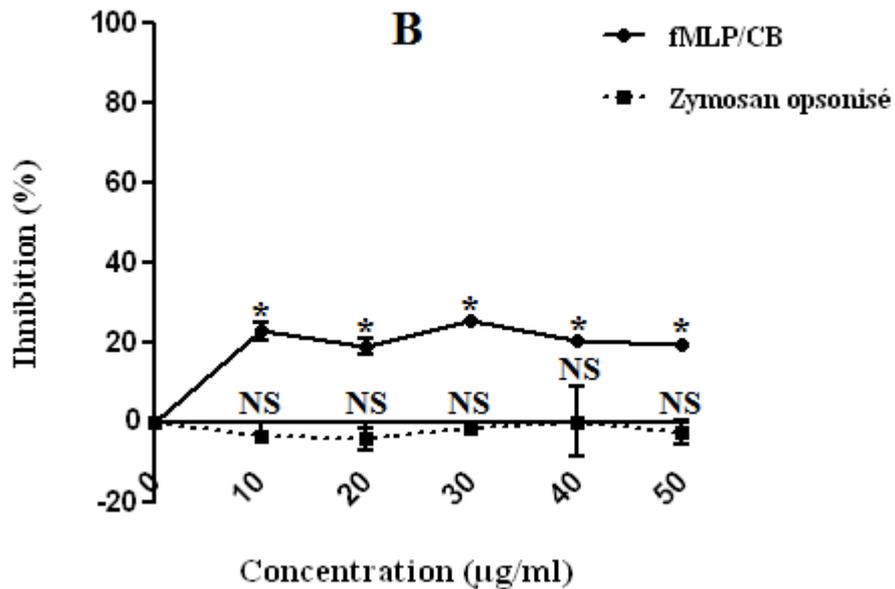
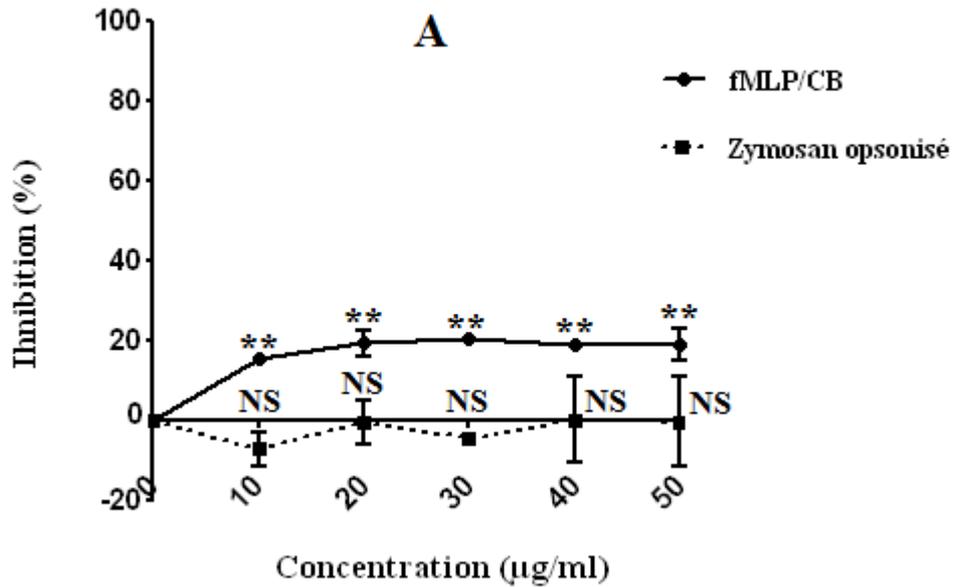


Figure 19: Effets des extraits aqueux des bourgeons floraux (A) et des feuilles (B) du câprier sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l’fMLP/CB ou par le zymosan opsonisé. Les neutrophiles (5.5×10^6 cellule/ml) sont pré-incubés à 37°C pendant 10 min en présence de différentes concentrations de l’extrait aqueux (10 - 50 µg/ml), puis activés par le stimulus approprié, fMLP/CB (10^{-6} M/ 10^{-5} M) ou le zymosan opsonisé (0,5 mg/ml). Les résultats sont exprimés en pourcentage d’inhibition de la dégranulation des neutrophiles par rapport au contrôle considéré comme le 100% d’activité. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; ** $p < 0.01$ (test t de Student).

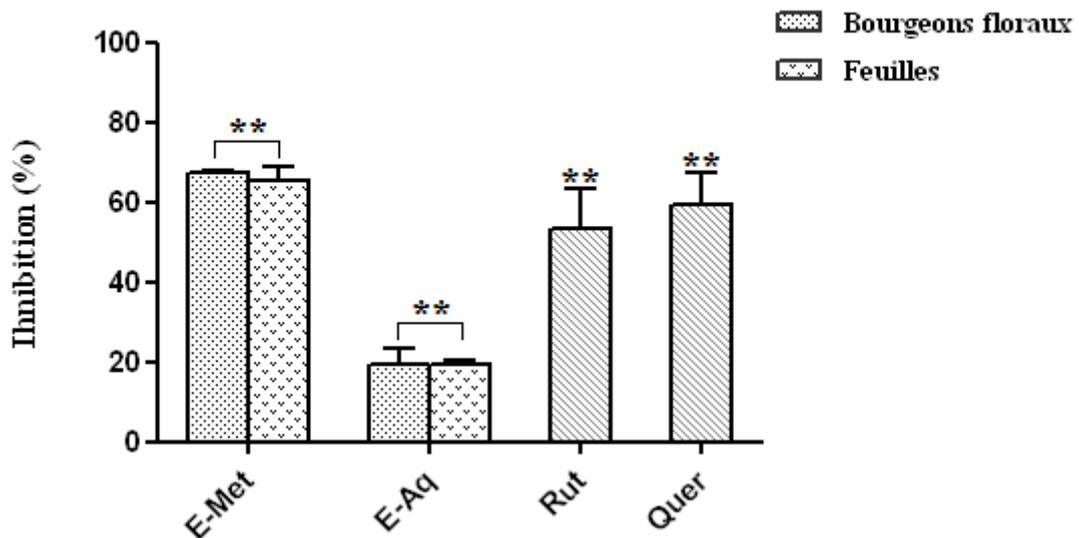


Figure 20: Effets des extraits du câprier, de la rutine et de la quercétine sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par l’fMLP/CB. Les neutrophiles (5.5×10^6 cellules/ml) sont pré-incubés à 37°C pendant 10 min en présence de $100 \mu\text{g/ml}$ de l’extrait méthanolique (E-Met) des bourgeons et des feuilles, de $50 \mu\text{g/ml}$ de l’extrait aqueux (E-Aq) des deux parties la plante et en présence de $25 \mu\text{M}$ de la rutine (Rut) ou de la quercétine (Quer) , puis activés par fMLP/CB ($10^{-6}\text{M}/10^{-5} \text{M}$). Les résultats sont exprimés en pourcentage d’inhibition de la dégranulation des neutrophiles par rapport au contrôle considéré comme le 100% d’activité. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SD. Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; $**p < 0.01$ (test t de Student).

5. Etude du chimiotactisme des neutrophiles humains

Les neutrophiles pré- incubés en présence de différentes concentrations des substances étudiées migrent vers l'agent chimioattractant (fMLP, 10^{-7} M) en s'infiltrant à travers les pores du filtre déposé contre les puits du compartiment inférieur.

Nos résultats montrent qu'en présence de l'agent chimioattractant (fMLP), le nombre des neutrophiles qui migrent est beaucoup plus grand ($95 \pm 0,72$) qu'en son absence ($14 \pm 2,27$). La différence est statistiquement significative ($p < 0.01$) (figure 21).

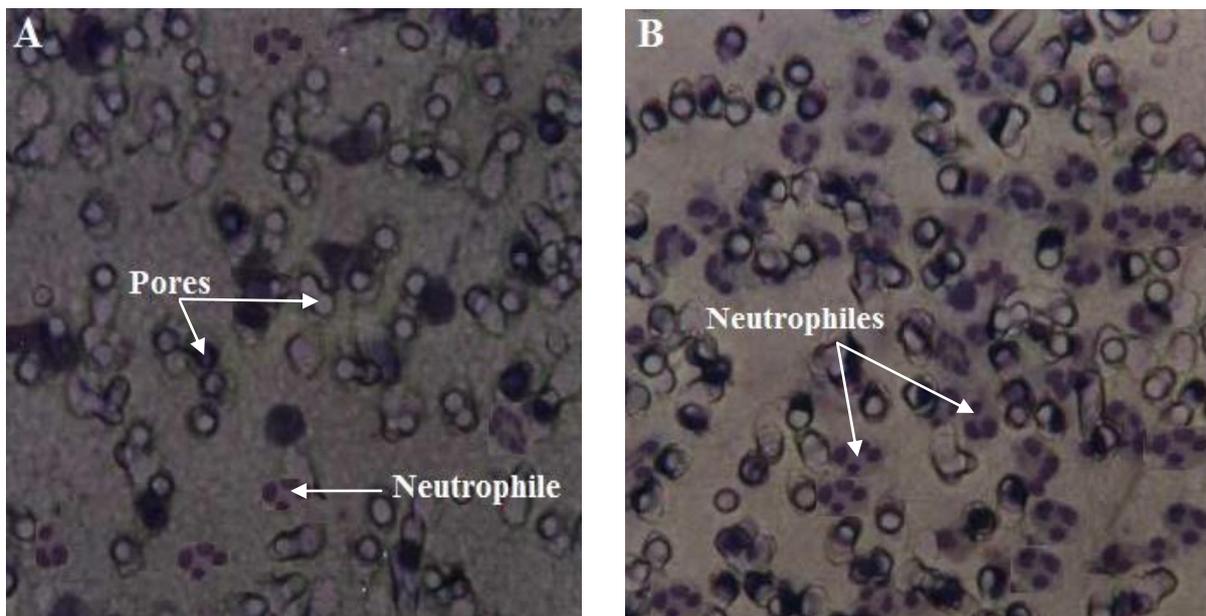


Figure 21: Adhésion des neutrophiles humains sur les filtres après leur migration en absence (A) et en présence de l'fMLP (B). Les neutrophiles (1.5×10^6 cellules/ml) sont incubés dans le HBSS₂ contenant 0,25% d'ovalbumine pendant 90 min à 37°C, dans un milieu humide et riche en CO₂ en présence. Après incubation, fixation dans le méthanol et coloration par le Wright Stain, la lecture est effectuée au grossissement X1000.

5.1. Effet des extraits méthanoliques du câprier sur le chimiotactisme

L'incubation des neutrophiles en présence de différentes concentrations des extraits méthanoliques du câprier (50-300 µg/ml) a considérablement aboli la migration des neutrophiles induite par l'fMLP. Les inhibitions obtenues sont similaires pour les deux extraits, comme elles sont positivement corrélées à la concentration des extraits jusqu'à une concentration égale à 150 µg/ml pour l'extrait des bourgeons et 200 µg/ml pour l'extrait des feuilles (figure 22). A des concentrations supérieures à celles-ci et pour les deux extraits, l'activité anti-chimioattractante reste stable et forme un plateau à une valeur de 85% pour l'extrait des bourgeons et de 93% pour l'extrait des feuilles.

Les IC₅₀ sont estimés à 56,25 µg/ml pour l'extrait des bourgeons et de 51,25 µg/ml pour l'extrait des feuilles.

5.2. Effet des extraits aqueux du câprier sur le chimiotactisme

L'extrait aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier provoque une inhibition de la migration des neutrophiles induite par le fMLP légèrement moins importante que celle exercée par l'extrait méthanolique. La présence de ces deux extraits (50-300 µg/ml) a inhibé d'une manière dose-dépendante le chimiotactisme des neutrophiles (figure 22). Les inhibitions engendrées par ces deux extraits sont pratiquement identiques et atteignent un taux maximal de 71% pour l'extrait des bourgeons floraux et de 73% pour l'extrait des feuilles à la concentration de 250 µg/ml.

Les IC₅₀ enregistrées pour l'extrait aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier sur la migration des neutrophiles sont estimés à 75,55 µg/ml et 63,67 µg/ml pour chacun des deux extraits respectivement.

La figure 23 représente les effets des extraits du câprier, de la rutine, de la quercétine, et de l'aspirine (anti-inflammatoire standard), sur la migration des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP. Le traitement des neutrophiles avec 100 µM de la rutine, de la quercétine et de l'aspirine a engendré des inhibitions de la migration des neutrophiles de l'ordre de 51,84%, 71,81%, 97,84% respectivement. Comme la figure le montre, l'extrait méthanolique des feuilles et des bourgeons floraux exhibe un pouvoir inhibiteur plus fort que celui de l'extrait aqueux dans le cas des deux parties de la plante. Cet effet est proche de celui exercé par l'aspirine (100 µM). Par contre, l'extrait aqueux des deux parties de la plante représente un effet anti-chimioattractant plus faible par rapport à celui exercé par les extraits méthanoliques, mais proche à celui de la quercétine.

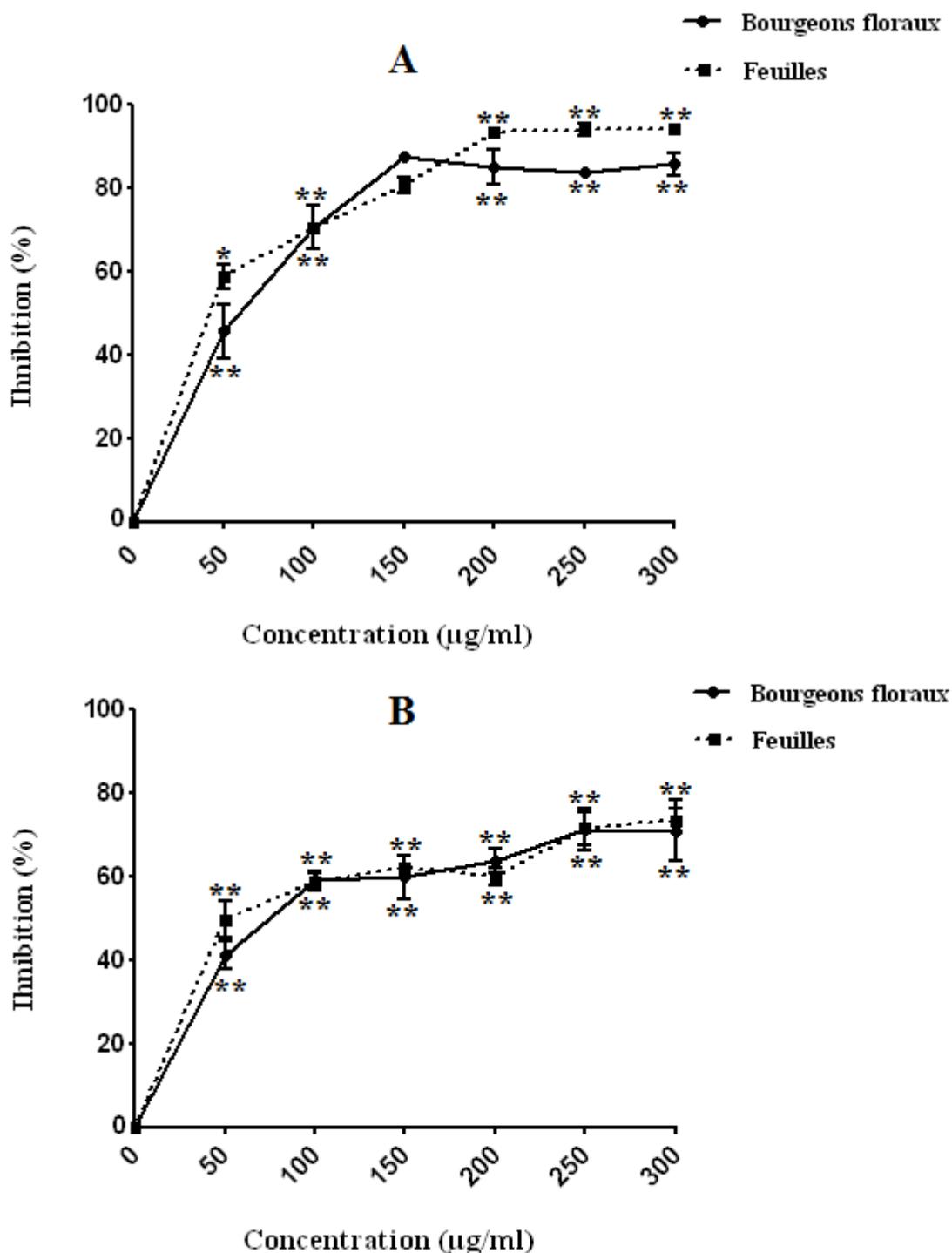


Figure 22: Effet de l'extrait méthanolique (A) et aqueux (B) du câprier sur le chimiotactisme des PMNs humains. Les neutrophiles (1.5×10^6 cellules/ml) sont incubés à 37° C pendant 90 min en présence des extraits méthanoliques et aqueux des bourgeons et des feuilles (50-300 µg/ml). Après incubation, le filtre est fixé dans le méthanol, puis coloré par le Wright Stain. La lecture est effectuée au grossissement X1000. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la migration des neutrophiles par rapport au contrôle considéré comme le 100% de la migration. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test t de Student).

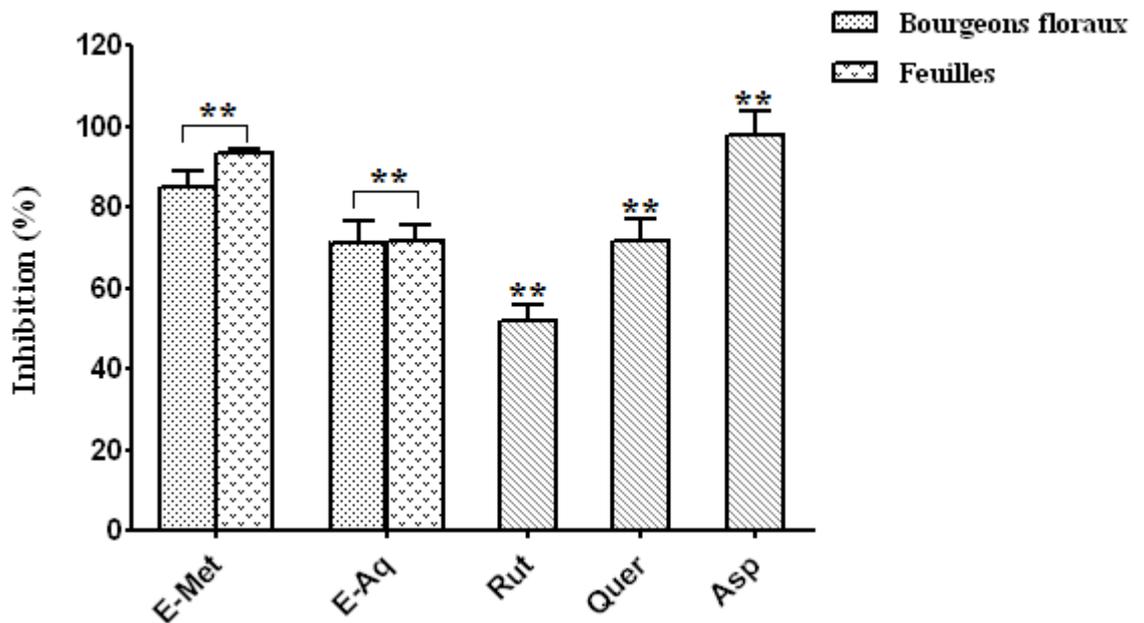


Figure 23: Effets des extraits du câprier, de la rutine, de la quercétine et de l'aspirine sur la migration des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP. Les neutrophiles (1.5×10^6 cellules/ml) sont incubés à 37°C pendant 90 min en présence de 150 et 200 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait méthanolique (E-Met) des bourgeons et des feuilles respectivement, et de 250 $\mu\text{g/ml}$ des extraits aqueux (E-Aq), de 100 μM de rutine (Rut), de la quercétine (Quer, 100 μM) ou d'aspirine (Asp, 100 μM) puis activés par fMLP (10^{-7} M). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la migration des neutrophiles par rapport au contrôle considéré comme le 100% de migration. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test t de Student).

DISCUSSION

DISCUSSION

1. Préparation des extraits de *Capparis spinosa*

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits méthanoliques et aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier, deux méthodes d'extraction sont utilisées. La première est l'ébullition du matériel végétal pendant 15min, pour une extraction plus efficace le matériel végétal est utilisé en poudre. Toutefois, l'eau n'est pas le solvant idéal pour plusieurs constituants bioactifs des plantes, Il permet d'extraire préférentiellement les composés polaires. Mais à température élevée, elle peut aussi extraire quelques composés amphiphiles (Jones et Kinghon, 2006).

Dans la deuxième méthode d'extraction, on a utilisé un mélange hydroalcoolique (méthanol/eau) pour extraire le plus de composés possibles, vue la capacité du méthanol d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires et de faciliter l'extraction d'un grand nombre de composés polaires ainsi que des composés de moyenne et de faible polarité. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet de prévenir leur dénaturation ou modification probable due à la température élevée utilisée (Seidel, 2006).

Le rendement de l'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction, le temps, la température, le solvant utilisé et la nature chimique de l'échantillon (Su *et al.*, 2006). Dans la présente étude, l'extraction aqueuse des feuilles et des bourgeons floraux du câprier a donné un rendement deux fois plus élevé (20%) que celui obtenu par l'extraction méthanolique (10%), bien que le temps est plus long (15 min et 24 heures). Cette différence est due probablement à la température, car les parties utilisées sont les mêmes dans les deux types d'extractions.

2. Utilisation des neutrophiles humains

Les polymorphonucléaires neutrophiles constituent un des plus puissants systèmes de défense innée de l'homme contre les agents pathogènes qui franchissent la barrière cutanéomuqueuse, et contre toutes les structures reconnues comme étrangères telles que les cellules et les molécules endogènes altérées. Leur action est le plus souvent bénéfique à l'organisme en participant à l'élimination des agents pathogènes. Cependant les PMNs sont également des armes à double tranchant, car une activation excessive ou prolongée dans un lieu inapproprié peut conduire à des lésions tissulaires sévères impliquées dans la

physiopathologie de différentes maladies inflammatoires aiguës ou chroniques (Gougerot-Pocidalò et Halb wachs-Mecarelli, 2005).

Vu l'implication des neutrophiles dans l'inflammation aiguë et chronique, la modulation des fonctions de ces prend part dans le traitement des maladies inflammatoires par les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens, ainsi que par plusieurs plantes médicinales douées de propriétés anti-inflammatoires.

In vitro, de nombreuses expérimentations utilisent les neutrophiles comme modèle cellulaire afin d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires des plusieurs molécules bioactives. Dans cette étude, les PMNs sont isolés selon une méthode qui permet de donner plus de 95 % du neutrophile vivante.

3. Evaluation de la toxicité des extraits du câprier envers les neutrophiles

L'évaluation de la toxicité des substances testées envers les PMNs est indispensable avant de tester leurs propriétés pharmacologiques. Dans la présente étude, cet effet est évalué par le test d'exclusion au bleu de trypan.

Les résultats obtenus ont montré que les extraits aqueux et méthanoliques du câprier (jusqu'à 500 µg/ml) et les deux flavonols utilisés pour la comparaison (rutine et quercétine) à 100 µM ne représentent aucun effet toxique. De tels résultats indiquent que l'effet des extraits du câprier et des flavonols testés sur les fonctions du neutrophile ne pourrait être dû à un effet toxique. En effet, des études antérieures ont rapporté que les extraits du câprier ne représentent aucun effet toxique sur plusieurs types cellulaires. Panicoa et ses collaborateurs (2005) ont montré que l'extrait méthanolique du câprier (200 µg/ml) ne présente aucun pouvoir toxique sur les chondrocytes. Arena et ses collaborateurs (2007) ont également rapporté que l'extrait aqueux des bourgeons floraux du câprier (600 µg/ml) n'a aucun effet toxique sur les leucocytes mononucléaires. En outre, plusieurs études ont rapportées que depuis l'antiquité, le câprier est utilisé en cuisine et dans la phytothérapie traditionnelle sans avoir un effet toxique (Tesoriere *et al.*, 2007 ; Demir *et al.*, 2008). Cette épineuse plante est actuellement intensivement cultivée dans de nombreux pays comme l'Italie, l'Espagne, le Maroc, la Turquie où elle est commercialisée et exportée principalement vers les pays de l'Europe centrale et les Etats-Unis d'Amérique afin d'être utiliser en alimentation et en industrie pharmaceutique (Giuffrida *et al.*, 2002 ; Romeo *et al.*, 2007).

Plusieurs études, ont rapporté que les propriétés thérapeutiques des plantes utilisées en médecine traditionnelle sont dues à leurs richesse en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les triterpenoïdes, les stérols, les tannins, les alcaloïdes, les sesquiterpenoïdes,

les curcumines, les coumarines, les composés phénoliques, les caroténoïdes, les vitamines (A, E et C), les huiles essentielles et volatiles et les polysaccharides (Iwalewa *et al.*, 2007 ; Satyanarayana *et al.*, 2008). Le câprier représente une source très importante en flavonoïdes, il renferme également la rutine, la quercétine, leurs dérivés glycosilés et les dérivés glycosilés du kaempférol (Sharaf *et al.*, 2000 ; Bonina *et al.*, 2002 ; Satyanarayana *et al.*, 2008). Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés sous forme de fruits, légumes et boissons (Ghedira, 2005). D'une manière générale la quantité de flavonoïdes consommée quotidiennement varie selon le régime alimentaire, de 2.6 à 68.2 mg/jour (Nijveldt *et al.*, 2001). Ces quantités peuvent fournir à l'homme une concentration pharmacologique sans aucun effet toxique (Ghedira, 2005). Dans les dernières décennies, plusieurs recherches se sont orientées vers les flavonoïdes connus par leurs activités biologiques et pharmacologiques et récemment ils sont commercialisés sous forme de médicaments. En effet, plusieurs formes pharmaceutiques sont préparées à base de flavonoïdes pour le traitement de certaines maladies, comme le Daflan qui est utilisé contre les maladies vasculaires, dont son principe actif est la diosmine (Korthuis et Gute, 1999), le Pantescal™, un extrait du câprier riche en flavonoïdes incluant des dérivés de quercétine et de kaempférol ainsi que des acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide férulique, acide p-cumarique et acide cinnamique) qui est inscrit pour le traitement de certaines maladies inflammatoires. L'utilisation des flavonoïdes à des doses recommandées dans les domaines pharmaceutiques prouve que ces substances sont dépourvues de tout effet toxique pour l'organisme.

4. Effet des extraits du câprier sur l'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles

Une des particularités du neutrophile est d'être une cellule compartimentée. Au repos, des molécules prêtes à l'emploi sont stockées dans des compartiments séparés dans la cellule. Sous l'effet d'un stimulus, une décompartimentalisation permet de déclencher rapidement des fonctions effectrices par mise en contact de ces différentes molécules, comme par exemple la mobilisation des différents granules du neutrophile. Cette dégranulation permet une libération dans le phagosome et dans le milieu extracellulaire de molécules protéolytiques et hydrolytiques comme la myéloperoxydase, l'élastase, la cathépsine G, la lactoferrine, les collagénases et la gélatinase (Gougerot-Pocidallo et Halbwachs-Mecarelli, 2005).

Dans notre étude l'activité de l'élastase libérée par les granules azurophiles est utilisée comme indice de la dégranulation des PMNs. Plusieurs auteurs ont rapporté que la libération

de l'élastase est un marqueur typique pour la détection de la dégranulation des PMNs activés (Vocks *et al.*, 2003; Tuluc *et al.*, 2004). Toutefois, d'autres enzymes sont utilisées comme indicateurs de la dégranulation telle que la myéloperoxidase (Wanikiat *et al.*, 2008), la β -glucuronidase et la lactoferrine (Mócsai *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2007).

Dans un premier temps, l'effet des extraits du câprier sur l'activité de l'élastase est vérifié. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux des deux parties du câprier à 100 $\mu\text{g/ml}$ et à 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivement, ainsi que la rutine et la quercétine à 25 μM , ne représentent aucun effet inhibiteur significatif sur l'activité de l'élastase. Ceci indique que tout effet exercé par ces substances sur la dégranulation des PMNs n'est pas dû à leur action sur l'activité de l'élastase.

L'extrait méthanolique des bourgeons floraux et des feuilles du câprier à des concentrations élevées (125 à 500 $\mu\text{g/ml}$) a montré un effet inhibiteur concentration-dépendante sur l'activité de l'élastase. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Panico et ses collaborateurs (2005) qui ont montré que l'extrait méthanolique du câprier est doué d'un effet anti-protéolytique. En outre, Demir et ses collaborateurs (2008) ont pu isoler à partir des bourgeons floraux du câprier une protéase à cystéine, qui est probablement responsable de l'activité anti-élastasique de cette plante.

L'analyse de la composition chimique des extraits du câprier a montré la présence de multiples molécules bioactives, telles que les polyphénols et les flavonoïdes. Ces composés sont probablement impliqués dans la modulation de certaines fonctions effectrices du neutrophile. En effet, Paula et ses collaborateurs (2009) ont montré l'effet inhibiteur des composés phénoliques sur l'activité catalytique de l'élastase. Les flavonoïdes présentent également un effet anti-élastasique, soit directement en inhibant cette enzyme, soit indirectement via leur activité anti-oxydante, en piégeant certains radicaux libres et en inhibant certains systèmes enzymatiques (Middleton *et al.*, 2000) protégeant ainsi l'activité des inhibiteurs spécifiques de l'élastase comme l' α -antitrypsine (Dallegrì et Ottonello, 1997 ; Bouriche *et al.*, 2007).

5. Effet des extraits du câprier sur la dégranulation des neutrophiles

L'activation de la dégranulation des neutrophiles est réalisée dans la présente étude par deux stimuli ; le fMLP, ligand d'un récepteur à protéine G, et le zymosan opsonisé par le sérum, un agoniste des récepteurs du complément (CR3) et des immunoglobulines (Fc γ R) qui déclenchent diverses voies de signalisation via l'activation des Src tyrosine kinases (Hazan *et al.*, 2000 ; Matsui *et al.*, 2002). Malgré que leurs récepteurs sont différents, le fMLP et

le zymosan opsonisé activent en commun plusieurs voies de signalisation au sein du neutrophile à savoir la PI3 kinase, la protéine kinase C, les tyrosines kinases, les phospholipases, les MAP kinases et les petites GTPases (Lattin *et al.*, 2007).

Les résultats obtenus indiquent que l'utilisation de l'fMLP supplémenté par la cytochalasine B (fMLP/CB) ou le zymosan opsonisé activent fortement la dégranulation des neutrophiles. Ce résultat paraît évident, car dans les conditions physiologiques normales, les différents granules des PMNs sont stockés dans le cytosol, suite à l'exposition à un agent dégranulant les neutrophiles commencent à mobiliser leur contenu en granules (N'Diaye *et al.*, 1998).

L'fMLP/CB (10^{-6} M/ 10^{-5} M) a montré un effet dégranulant puissant vis-à-vis les neutrophiles humains, l'addition de la cytochalasine B à l'fMLP est indispensable (Tuluc *et al.*, 2004). En effet, la cytochalasine B intervient dans le blocage de la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine. Ce blocage facilite la fusion des granules avec la membrane plasmique puis la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire (Naucér *et al.*, 2002).

Dans le cas de l'activation des PMNs par le zymosan opsonisé (0,5 mg/ml), la libération de l'élastase par les granules azurophiles est plus lente et plus faible que celle induite par les PMNs fMLP/CB stimulés. *In vitro*, suite à une activation par l'fMLP de l'ordre du nanomolaire, la dégranulation des neutrophiles est presque complète (types de granules), alors que la stimulation par le zymosan opsonisé mène à une dégranulation des granules azurophiles seulement (N'Diaye *et al.*, 1998 ; Faurschou et Borregaard, 2003).

Il a été rapporté que dans le cas des deux stimuli, la libération de l'élastase par les granules azurophiles est Ca^{+2} -dépendante et l'augmentation du calcium intracellulaire est un facteur principal de la dégranulation (Faurschou et Borregaard, 2003 ; Herrmann *et al.*, 2007). Cependant, lors d'une stimulation par le zymosan opsonisé, l'influx calcique est spatialement et temporellement différent de celui induit par le fMLP. En effet, la phagocytose du zymosan opsonisé induit deux influx calciques distincts (Dewitt et Hallett, 2002). Tout d'abord, la fixation de la particule sur les récepteurs membranaires de la cellule provoque une première libération de Ca^{+2} intracellulaire près de la membrane plasmique au niveau du point de contact (Dewitt *et al.*, 2003). Ce flux est supposé stimuler la diffusion d'autres molécules réceptrices au point de contact afin de compléter le processus de phagocytose. Une seconde augmentation globale de la concentration cytosolique en Ca^{+2} se produit au moment de la fermeture du phagosome. Un tel retard dans la formation de gradient de Ca^{+2} et leur distribution non uniforme dans le cytosol peut expliquer la libération retardée des granules

primaires. De même, lors de la stimulation des neutrophiles par le zymosan opsonisé, il paraît que la polymérisation des filaments d'actine est un événement clé afin de compléter le processus de la phagocytose et de guider les phagosomes vers les granules azurophiles (Nauclér *et al.*, 2002). De ce fait, il est suggéré que la polymérisation des filaments d'actine, qui constituent avec leurs microfilaments une barrière sub-membranaire peut interférer le processus de la fusion des granules avec la membrane plasmique puis la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire (Nauclér *et al.*, 2002).

Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique des bourgeons floraux de la plante exerce un effet inhibiteur similaire sur la dégranulation des neutrophiles à celui exercé par l'extrait méthanolique des feuilles. La même remarque est faite pour les extraits aqueux des deux parties de la plante. Ces résultats témoignent de la présence de substances douées d'activité anti-dégranulante dans les deux parties de la plante. En effet, plusieurs études ont rapporté la présence d'une variété de molécules bioactives comme les polyphénols, les flavonoïdes, les glucosinolates, les huiles essentielles dans les deux parties de la plante (Guiffrida *et al.*, 2002; Tesoriere *et al.*, 2007; Satyanarayana *et al.*, 2008).

Puisque le câprier contient un amalgame de flavonoïdes tels que la rutine et la quercétine, leurs effets sur la dégranulation des neutrophiles ont été testés. La rutine et la quercétine à 25 μM exercent un effet inhibiteur remarquable vis-à-vis de la dégranulation des PMNs stimulés par le fMLP/CB. Il a été rapporté que la quercétine inhibe également, la libération de la β -glucuronidase induite par le fMLP (Tordera *et al.*, 1994), ou par le zymosan opsonisé (Middleton *et al.*, 2000). En outre, plusieurs études ont montré l'effet inhibiteur de la rutine et de la quercétine sur la dégranulation des neutrophiles à travers l'inhibition de certaines enzymes clés impliquées dans la transduction du signal dans le neutrophile. Selloum et ses collaborateurs (2001) ont montré que la rutine inhibe l'activité de la PI 3-kinase γ , qui est une voie importante mais non exclusive dans la transduction du signal dans le neutrophile stimulé par le fMLP ou le zymosan opsonisé (Lindmo et Stenmark, 2006). Plusieurs études rapportent l'implication d'autres enzymes dans ce processus comme la protéine kinase C, les tyrosines kinases, les MAP kinases et les phospholipases (Sergeant et McPhail, 1997 ; Hazan-Halevy, 2000 ; Zarbock et Ley, 2008). Ces enzymes sont également affectées par certaines flavonoïdes tel que la quercétine, la rutine et le kaempférol (Middleton *et al.*, 2000 ; Ghedira, 2005 ; Trombetta *et al.*, 2005 ; Iwalewa *et al.*, 2007).

La teneur élevée en composés polyphénoliques peut être trouvée dans les extraits des différentes parties du câprier (Satyanarayana *et al.*, 2008). D'après les résultats obtenus l'extrait méthanolique des bourgeons floraux et des feuilles du câprier montre un effet

inhibiteur sur la dégranulation des neutrophiles fMLP stimulés relativement supérieur à celui observé avec la rutine et la quercétine à 25 μM . Cette inhibition peut être expliquée par la présence des flavonoïdes dans ces extraits. Effectivement, plusieurs études antérieures ont montré la richesse des extraits du câprier en composés phénoliques principalement les flavonoïdes, y compris la rutine, la quercétine et leurs dérivés glycosylés et les dérivés glycosylés du kaempférol (Panico *et al.*, 2005 ; Tesoriere *et al.*, 2007 ; Satyanarayana *et al.*, 2008). Cependant les propriétés inhibitrices des extraits du câprier enregistrées sur la dégranulation des neutrophiles ne peuvent pas être attribuées à un composé particulier, mais au phytocomplexe en sa totalité. En effet, la présence d'autres composés comme les anthocyanidines, les caroténoïdes, les vitamines, les lipides, les glucuronates peuvent avoir un effet anti-inflammatoire synergique avec les polyphénols (Germanò *et al.*, 2002).

Il a été suggéré que le faible effet inhibiteur faible des extraits aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier est dû au fait que cet extrait ne contient que des substances hydrosolubles qui ne peuvent agir synergiquement avec d'autres composés de moyenne et de faible polarité présent dans l'extrait méthanolique (Seidel, 2005). Comme ça pourrait être dû aux faibles concentrations utilisées de l'extrait.

6. Effet des extraits du câprier sur le chimiotactisme des neutrophiles

La migration des neutrophiles est stimulée dans ce travail par le fMLP (10^{-7} M), un chimioattractant standard qui active les neutrophiles par la liaison à son récepteur membranaire associé à la protéine G. La stimulation de cette protéine déclenche un signal qui sera transmis, via différentes molécules de signalisation jusqu'aux éléments de cytosquelette du neutrophile, principalement les filaments d'actine. La réorganisation de l'actine génère la force locomotrice nécessaire à la motilité du neutrophile (Zarbock et Ley, 2008).

Suite à l'exposition à un gradient de chimioattractant les neutrophiles se déplacent d'une manière unidirectionnelle guidés par le sens croissant en chimioattractant (Van Haaster et Devreotes, 2004). Par contre, en absence du chimioattractant, les PMNs se déplacent d'une manière aléatoire, pluridirectionnelle et ne s'éloignent pas significativement de leurs sites initiaux (Harvath, 1991).

Comme dans le cas de la dégranulation, les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique des bourgeons floraux du câprier présente un effet inhibiteur sur la migration des PMNs similaire à celui exercé par le même extrait des feuilles de la plante. De même, les extraits aqueux des deux parties de la plante ont donné un effet inhibiteur similaire sur la migration des PMNs. Cela indique que les composés responsables de cette activité sont

présents aussi bien dans les bourgeons floraux que dans les feuilles de la plante. D'un autre côté, l'extrait méthanolique des deux parties de la plante exerce un effet inhibiteur supérieur à celui exercé par l'extrait aqueux des deux parties, ce qui peut être dû à la présence de substances lipophiles dans l'extrait méthanolique qui peuvent agir en synergie avec les substances hydrosolubles (Seidel, 2005). L'inhibition exercée par l'extrait méthanolique est statistiquement similaire à celle exercée par l'aspirine qui est un anti-inflammatoire standard.

Plusieurs études antérieures ont montré que les propriétés anti-inflammatoires du câprier selon différents modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* sont dues principalement à leurs composés phénoliques, avec prédominance des flavonoïdes et leurs dérivés glycosilés. Effectivement, la quercétine et la rutine utilisée pour la comparaison à 100µM inhibent significativement la migration des neutrophiles en réponse à l'fMLP. La capacité des flavonoïdes à moduler les fonctions des neutrophiles a été étudiée par Middleton et ses collaborateurs (2000). Il a été suggéré que les flavonoïdes agissent par la répression des enzymes impliquées dans l'induction de la réponse cellulaire (Ghedira, 2005 ; Trombetta *et al.*, 2005 ; Iwalewa *et al.*, 2007).

La capacité des extraits du câprier à moduler les fonctions effectrices des neutrophiles n'a pas été investiguée auparavant, cependant plusieurs études antérieures ont montré les propriétés anti-inflammatoires de cette plante. Trombetta et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que l'extrait méthanolique des bourgeons floraux du câprier présente un effet antihistaminique et antiallergique. Il a été suggéré que cette activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de la plante est due à leur composition chimique, en particulier leur richesse en flavonoïdes. Cette possibilité est soutenue par les résultats de Panico et ses collaborateurs (2005) qui ont rapporté que l'extrait méthanolique contient relativement une importante quantité de flavonoïdes et est doué d'activité chondro-protective. D'après ces auteurs, les dérivés glucosylés de la quercétine et du keampférol ainsi que les acides hydrocynnamiques présents dans l'extrait méthanolique des câpres sont dotés d'un pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire en réduisant la production des espèces réactifs de l'oxygène, des prostaglandines et des cytokines à partir des chondrocytes stimulés. Satyanarayana et ses collaborateurs (2008) ont également rapporté que l'extrait aqueux de la partie aérienne du câprier possède un effet anti-inflammatoire, en effet, le capparénol-13 isolé à partir du câprier a inhibé considérablement l'œdème de l'oreille des rats induit par la carragénane. En outre, Arena et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'extrait méthanolique des bourgeons floraux du câprier exhibe un effet antiviral et des propriétés immun-modulatrices.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans la présente étude, nous avons étudié les effets anti-inflammatoires des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles et des bourgeons floraux de *Capparis spinosa* du câprier. Pour cela, nous avons évalué l'effet de ces extraits sur la dégranulation et la migration des neutrophiles humains.

Les deux extraits méthanoliques des deux parties de la plante ont montré un effet inhibiteur remarquable sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par le fMLP ou par le zymosan opsonisé. De même, ces deux extraits ont révélé un effet anti-chimiotactique très puissant envers les neutrophiles-fMLP stimulés.

Les extraits aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier ont présenté un effet inhibiteur faible sur la dégranulation des neutrophiles-fMLP stimulés. Ces deux extraits n'ont exhibé aucun effet inhibiteur sur la dégranulation des neutrophiles humains stimulés par le zymosan opsonisé. Ces extraits ont inhibé la migration des neutrophiles humains, mais à des degrés moindres que celle observée avec l'extrait méthanolique.

Les résultats obtenus, permettent de conclure que le câprier possède des propriétés anti-inflammatoires importantes via son activité anti-chimiotactique et anti-dégranulante. De tels résultats supportent l'usage traditionnel de cette plante dans le soulagement de diverses maladies inflammatoires. Cependant des études complémentaires approfondies sont nécessaires pour comprendre leurs mécanismes moléculaires en se focalisant sur :

- * La caractérisation des composés bioactifs dans les extraits du câprier,
- * L'étude de l'activité anti-inflammatoire, par différents tests *in vitro* et *in vivo*, de chaque composé pour mieux déterminer le principe actif responsable de l'effet anti-inflammatoire de chaque extrait,
- * L'utilisation des différents stimuli pour déterminer les voies de signalisation dans le neutrophile de chaque extrait et de chaque molécule bioactive dans ces extraits.

***RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES***

RÉFÉRÉNCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, **42**, 665-672.
- Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE (1998). A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *The Journal of Cell Biology*, **141**, 1147-57.
- Alon R, Feigelson S (2002). From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Seminars in Immunology*, **14**, 93-104.
- Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *The Journal of Cell Biology*, **128**, 1243-1253.
- Arena A, Bisignano G, Pavone B, Tomaino A, Bonina FP, Saija A, Cristani M, D'Arrigo M, Trombetta D (2007). Antiviral and immunomodulatory effect of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. Buds. *Phytotherapy Research*, **22**, 313-317.
- Azuma Y, Kosaka K, Kashimata M (2007). Phospholipase D-dependent and-independent p38MAPK activation pathways are required for superoxide production and chemotactic induction, respectively, in rat neutrophils stimulated by fMLP. *European Journal of Pharmacology*, **568**, 260-268.
- Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *European Journal of Biochemistry Letters*, **307**, 97-101.
- Bieth J, Spiess B, Wermuth CG (1974). The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochemistry of Medicine*, **11**, 350-357.
- Blander JM, Medzhitov R (2004). Regulation of phagosome maturation by signal from toll-like receptors. *Science*, **304**, 1014-1018.
- Bonina F, Puglia C, Ventura D, Aquino R, Tortora S, Sacchi A, Saija A, Tomaino A, Pellegrino ML, De Capraris P (2002). In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds. *Journal of Cosmetic Science*, **53**, 321-335.
- Borelli V, Perrotta MG, Vita F, Soranzo MR, Zabucchi G (2002). A new assay to monitor the degranulation process in phagocytizing human neutrophil. *Inflammation*, **26**, 45-60.
- Borregaard N, Cowland JB (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, **89**, 3503-3521.

- Botting RM, Botting JH (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clinical Drug Investigation*, **19**, 1-7.
- Boulay F, Tardif M, Brouchon L, Vignais P (1990). The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry*, **29**, 11123-11133.
- Bouriche H (2005). Modulation of inflammation by Cleome Arabica leaf extract, rutin and quercetin, studied *in vivo* and *in vitro*. Doctorat d'état thesis. Department of biology-UFAS university, Algeria, pp 53-65.
- Bouriche H, Selloum L, Tigrine C, Boudoukha C (2003). Effect of Cleome Arabica leaf extract on rat oedema and human neutrophil migration. *Pharmaceutical Biology*. **41**, 15-15.
- Bouriche H, Boudoukha C, Belambri SA, Boussif A, Senator A (2009). Implication of tyrosine kinases, PKC, PI3 kinase in signaling pathways of human neutrophil chemotaxis, respiratory burst and degranulation. *Sciences, Technologies & Développement*, **5**, 89-104.
- Bouriche H, Lessig PSJ, Arnold T (2007). Differential effects of flavonols on inactivation of alpha 1-antitrypsin induced by hypohalous acids and the myeloperoxidase-hydrogen peroxidase-halide system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **459**, 137-142.
- Breneton J (1999). Pharmacognosie : phytochimie, Plantes médicinales, 2^{ème} édition, technique et documentation, (Paris), pp : 220-518.
- Bressan E, Tonussi CR (2008). Antiinflammatory effects of etoricoxib alone and combined with NSAIDs in LPS-induced reactive arthritis. *Inflammation Research*, **57**, 586-592.
- Brown EJ (1991). Complement receptors and phagocytosis, *Current Opinion in Immunology*, **3**, 76-82.
- Brunger AT (2000). Structural insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent exocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*, **10**, 293-302.
- Buercher B, Heymann M-F, Blottière HM (2001). Rationnel et perspectives d'utilisation des inhibiteurs de cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les cancers colorectaux. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, **25**, 967-978.
- Burns AR, Walker DC, Brown ES, Thurmon LT, Bowden RA, Keese CR, Simon SI, Entman ML, Smith CW (1997). Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *Journal of Immunology*, **159**, 2893-2903.
- Carter RA, Wicks IP (2001). Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106): a multifaceted regulator of joint inflammation. *Arthritis and Rheumatism*, **44**, 985-994.
- Cassatella MA, Bazzoni F, Ceska M, Ferro I, Baggiolini M, Berton G (1992). IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-

- leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *Journal of Immunology*, **148**, 3216-3220.
- Chakravarti A, Allaeyes I, Poubelle PE (2007). Neutrophil and immunity: is it innate or acquired?. *Medecine sciences*, **23**, 862-867.
- Chen S, Springer TA (1999). An automatic braking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear. *Journal of Cell Biology*, **144**, 185-200.
- Chen YA, Scheller RH (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature Review. Molecular Cellular Biololgy*, **2**, 98-106.
- Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M (2002). Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **13**, 220-228.
- Dale DC, Boxer L, Liles WC (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, **112**, 935-945.
- Dallegrì F, Ottonello L (1997). Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflammation Research*, **46**, 382-391.
- De Fougerolles AR, Qin X, Springer TA (1994). Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *The Journal of Experimental Medicine*, **179**, 619-629.
- Della Bianca V, Grzeskowiak M, Lissandrini D, Rossi F (1991). Source and role of diacylglycerol formed during phagocytosis of opsonized yeast particles and associated respiratory burst in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **177**, 948-955.
- Dewitt S, Hallett MB (2002). Cytosolic free Ca⁽²⁺⁾ changes and calpain activation are required for beta integrin-accelerated phagocytosis by human neutrophils. *The Journal of Cell Biology*, **159**, 181-9.
- Dewitt S, Laffafian I, Hallett MB (2003). Phagosomal oxidative activity during beta2 integrin (CR3)-mediated phagocytosis by neutrophils is triggered by a non-restricted Ca²⁺ signal: Ca²⁺ controls time not space. *The Journal of Cell Biology*, **116**, 2857-65.
- Demir Y, Güngör AA, Duran ED, Demir N (2008). Cysteine protease (Capparin) from capsules of caper (*Capparis spinosa*). *Food Technology and Biotechnology*, **46**, 286-291.
- Derbel S, Ghedira K (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, **1**, 28-34.
- Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA (1990). Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *The Journal of Experimental medicine*, **171**, 1155-1162.

- Dinareello CA (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, **87**, 2095-2147.
- Donato R (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy Research and Technique*, **60**, 540-551.
- Downy GP, Bulter JR, Tapper H, Failkow L, Salteil AR, Rubin BB, Granstein S (1998). Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *The Journal of Immunology*, **160**, 434-443.
- Driscoll KE (2000). TNF α and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicology Letters*, **112-113**, 177-183.
- Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K (2002). Control of leukocyte rolling velocity in TNF- α -induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*, **99**, 336-341.
- Dunzendorf S, Wiedermann CJ (2000). Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprilol. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **32**, 915-924.
- Eddouks M, Lemhadri A, Michel J-B (2005). Hypolipidemic activity of aqueous extract of *Capparis spinosa* L. in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **98**, 345-350.
- Eddy RJ, Pierini LM, Matsumura F, Maxfield FR (2000). Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *Journal of Cell Science*, **113**, 1287-1298.
- Engelhardt B, Wolburg H (2004). Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *European Journal of Immunology*, **34**, 2955-2963.
- Ellis V, Murphy G (2001). Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **506**, 1-5.
- Falk W, Goodwing RHJR, Leonard EJ (1998). A 48-Well microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *Journal of Immunological Methods*, **33**, 239-247.
- Faurschou M, Borregaard N (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, **5**, 1317-1327.
- Fu XP, Wu T, Abdurahim M, Su Z, Hou XL, Aisa HA, Wu H (2008). New spermidine alkaloids from *Capparis spinosa* roots. *Phytochemistry Letters*, **1**, 59-62.
- Furie MB, Tancinco MC, Smith CW (1991). Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood*, **78**, 2089-2097.
- Gadgoli C, Mishra SH (1999). Antihepatotoxic activity of *p*-methoxy benzoic acid from *Capparis spinosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, **66**, 187-192.

- Gahmberg CG, Tolvanen M, Kotovuori P (1997). Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *European Journal of Biochemistry*, **245**, 215-232.
- Gerke V, Moss SE (2002). Annexins: From structure to function. *Physiological Reviews*, **82**, 331-371.
- Germanò MP, De Pasquale R, D'Angelo V, Catania S, Silvani V, Costa C (2002). Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1168-1171.
- Greenberg S, Grinstein S (2002). Phagocytosis and innate immunity, *Current Opinion in Immunology*, **14**, 136-145.
- Ghedira K (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4**, 162-169.
- Giembycz MA, Lindsay MA (2000). Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacological Reviews*, **51**, 216-309.
- Giuffrida D, Salvo F, Ziino M, Toscano G, Dugo G (2002). Initial investigation on some chemical constituents of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Island of Salina. *Italian Journal of Food Science*, **14**, 25-33.
- Girre L (2001). Les plantes et les médicaments. Edition Delachaux et Niestlé SA, (Paris), pp : 62-187.
- Gopalan PK, Burns AR, Simon SI, Sparks S, McIntire LV, Smith CW (2000). Preferential sites for stationary adhesion of neutrophils to cytokine-stimulated HUVEC under flow conditions. *Journal of Leukocyte Biology*, **68**, 47-57.
- Gougerot-Pocidalò M-A, Halb wachs-Mecarelli L (2005). L'activation du polynucléaire neutrophile dans la synovite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme*, **72**, 303-309.
- Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Siefiring JE, Williams EP, Jasti AC, Harris CE, Lee AW, Prabhakar R, Atkinson SJ, Kwiatkowski DJ, Williams DA (2003). Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science*, **302**, 445-9.
- Han X, Wang CT, Bai J, Chapman ER et Jackson MB (2004). Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Science*, **304**, 289-292.
- Handa SS, Sharma A, Chakraborti KK (1986). Natural products and plants as liver protecting drugs. *Fitoterapia*, **57**, 307-349.
- Hannigan M, Zhang L, Li Z, Ai Y, Wu D, Huang CK (2002). Neutrophil lacking phosphoinositide 3-kinase γ show loss of directionality during N-formyl-Me-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proceeding of National Academy of Science*, **99**, 3603-3608.
- Harvath L (1991). Regulation of neutrophil chemotaxis: Correlation with actin polymerization. *Cancer Investigation*, **8**, 651-654.

- Hazan-Halevy I, Seger R, Levy R (2000). The requirement of both extracellular regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase for stimulation of cytosolic phospholipase A(2) activity by either FcγRIIA or FcγRIIIB in human neutrophils. A possible role for Pyk2 but not for the Grb2-Sos-Shc complex. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 12416-12423.
- Hazan I, Dana R, Granot Y, Levy R (1997). Cytosolic phospholipase A2 and its mode of activation in human neutrophils by opsonized zymosan. Correlation between 42/44 kDa mitogen-activated protein kinase, cytosolic phospholipase A2 and NADPH oxidase. *Biochemistry Journal*, **326**, 867-76.
- Henzen C (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum Médical Suisse*, **19**, 442-446
- Herrmann JM, Bernardo J, Long HJ, Seetoo K, McMennamin ME, Batista EL, Van Dyke TE, Simons ER (2007). Sequential Chemotactic and Phagocytic Activation of Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infection and Immunity*, **75**, 3989-3998.
- Hogg N, Henderson R, Leitinger B, McDowall A, Porter J, Stanley P (2002). Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunological Reviews*, **186**, 164-171.
- Hubbard AK, Rothlein R (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Biology & Medicine*, **28**, 1379-1386.
- Inocencio C, Rivera D, Alcaraz A, Tomás-Barberán FA (2000). Flavonoid content of commercial capers (*Capparis spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in mediterranean countries. *European Food Research Technology*, **212**, 70-74.
- Iwalewa EO, McGaw LJ, Naidoo V, Eloff JN (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, **6**, 2868-2885.
- James MJ, Penglis PS, Caughey GE, Demasi M, Cleland LG (2001). Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response?. *Inflammation Research*, **50**, 249-253.
- Jacobson RL, Schlein Y (1999). Lectins and toxins in the plant diet of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sandfly and in culture. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **93**, 351-356.
- Jiang H-E, Li X, Ferguson DK, Wang Y-F, Liu C-J, Li C-S (2007). The discovery of *Capparis spinosa* L. (*Capparidaceae*) in the Yanghai Tombs (2800 years b.p.), NW China, and its medicinal implications. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**, 409-420.
- Johnson-Leger C, Aurrand-Lions M, Imhof BA (2000). The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *Journal of Cell Science*, **113**, 921-933.

- Jones WP, Kingdon D (2006). Extraction of plant secondary metabolites: *In natural products isolation*. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa), pp : 334-335.
- Kaldi K, Szeberenyi J, Rada BK, Kovacs P, Geiszt M, Mócsai A, Ligeti E (2002). Contribution of phospholipase D and a brefeldin A-sensitive ARF to chemoattractant-induced superoxide production and secretion of human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, **71**, 695-700.
- Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL (1994). Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *Journal of Immunology*, **152**, 3559-3569.
- Kelly M, Hwang JM, Kubes P (2007). Modulating leukocyte recruitment in Inflammation. *Current Reviews of Allergy and Clinical Immunology*, **120**, 3-10.
- Klebanoff SJ (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, **77**, 598-625.
- Klenchin VA, Martin TFJ (2000). Priming in exocytosis: Attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie*, **82**, 399-407.
- Korthuis RJ, Gute DC (1999). Adhesion molecule expression in postischemic microvascular dysfunction: activity of a micronized purified flavonoid fraction. *Journal of Vascular Research*, **36**, 15-23.
- Kölsch V, Charest PG, Firtel RA (2008). The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *Journal of Cell Science*, **121**, 551-559.
- Lattin J, Zidar DA, Schroder K, Kellie S, Hume DA, Sweet MJ (2007). G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, **82**, 16-32.
- Laudanna C, Mochly-Rosen D, Liron T, Constantin G, Butcher EC (1998). Evidence of ζ protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 30306-30315.
- Lemhadri A, Eddouks M, Sulpice T, Burcelin R (2007). Anti-hyperglycaemic and Anti-obesity Effects of *Capparis spinosa* and *Chamaemelum nobile* Aqueous Extracts in HFD Mice. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, **2**, 106-110.
- Ligeti E, Attila Mócsai (1999). Commentary: Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochemical Pharmacology*, **57**, 1209-1214.
- Lindmo K, Stenmark H (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3 kinases. *Journal of Cell Science*, **119**, 605-614.
- Lou O, Alcaide P, Lusinskas FW, Muller WA (2007). CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *Journal of Immunology*, **178**, 1136-1143.
- Lynch JM, Henson PM (1986). The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor. *Journal of Immunology*, **137**, 2653-2661.

- Mandeville JT, Lawson MA, Maxfield FR (1997). Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol*, **61**, 188-200.
- McKenzie S E, Schreiber A D (1998). Fc gamma receptors in phagocytes, *Current Opinion in Hematology*, **5**, 16-21.
- Machesky LM, Gould KL (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Current opinion in Cell Biology*, **11**, 117-121.
- Matsui S, Matsumoto S, Adachi R, Kusui K, Hirayama A, Watanabe H, Ohashi K, Mizuno K, Yamaguchi T, Kasahara T, Suzuki K (2002). LIM Kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 544-549.
- Mayer A (2002). Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **18**, 289-314.
- McKenzie SE, Schreiber AD (1998). Fc gamma receptors in phagocytes. *Current Opinion in Hematology*, **5**, 16-21.
- Melia TJ, Weber T, McNew JA, Fisher LE, Johnston RJ, Parlati F, Mahal LK, Sollner TH, Rothman JE (2002). Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins. *Journal of Cell Biology*, **158**, 929-40.
- Menten P, Wuyts A, Van Damme J (2002). Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Reviews*, **13**, 455-481.
- Meshulam T, Diamond RD, Lyman CA, Wysong DR, Melnick DA (1988). Temporal association of calcium mobilization, inositol trisphosphate generation, and superoxide anion release by human neutrophils activated by serum opsonized and nonopsonized particulate stimuli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **150**, 532-539.
- Middleton EJR, Kandaswami C, Heoradies TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology Review*, **52**, 673-751.
- Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA (2002). Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, **100**, 3853-3860.
- Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA (2002). Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, **100**, 3853-3860.
- Miwa M, Sugatani J, Ikemura T, Okamoto Y, Ino M, Saito K, Suzuki Y, Matsumoto M (1992). Release of newly synthesized platelet-activating factor (PAF) from human polymorphonuclear leukocytes under in vivo conditions. Contribution of PAF-releasing factor in serum. *Journal of Immunology*, **148**, 872-880.

- Moerlot S, Firllet RA (2003). Leading the way: Directional sensing through phosphoinositide 3-kinase and other signaling pathway. *J Cell Sci.* **116**, 3471-3478. Muller W A (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunology*, **24**, 327-334.
- Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA, et Ligeti EB (2000). Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: The role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *The journal of Immunology*, **164**, 4321-4331.
- Muller WA (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunology*, **24**, 327-334.
- N'Diaye E-N, Darzacq X, Astarie-Dequeker C, Daffé M, Calafat J, Maridonneau-Parini I (1998). Fusion of Azurophil Granules with Phagosomes and Activation of the Tyrosine Kinase Hck Are Specifically Inhibited During Phagocytosis of Mycobacteria by Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*, **161**, 4983-4991.
- Naucler C, Grinstein S, Sundler R, Tapper H (2002). Signaling to localized degranulation in neutrophils adherent to immune complexes. *Journal of Leukocyte Biology*, **71**, 701-710.
- Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **74**, 418-25.
- Ostermann G, Weber K S, Zerneck A, Schroder A, Weber C (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature and Immunology*, **3**, 151-158.
- Özcan M, Aydın C (2004). Physico-mechanical Properties and Chemical Analysis of Raw and Brined Caperberries. *Biosystems Engineering*, **89**, 521-524.
- Paccaud JP, Schifferli JA, Baggiolini M (1990). NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **166**, 187-192.
- Palmer RM, Stepney RJ, Higgs GA, Eakins KE (1980). Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leucocytes of different species. *Prostaglandins*, **20**, 411-418.
- Panico AM, Cardile TV, Garufi F, Puglia C, Bonina F, Ronsisvalle G (2005). Protective effect of *Capparis spinosa* on chondrocytes. *Life sciences*, **77**, 2479-2488.
- Paula FS, Kabeya LM, Kanashiro A, de Figueiredo A SG, Azzolini AECS, Uyemura SA, Lucisano-Valim YM (2009). Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 163-170.
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JM (2000). Ligand binding to integrins. *Journal of Biology Chemistry*, **275**, 21785-21788.

- Powner DJ, Pettitt TR, Anderson R, Nash GB, Wakelam M J (2007). Stable adhesion and migration of human neutrophils requires phospholipase D-mediated activation of the integrin CD11b/CD18. *Mololucule and Immunology*, **44**, 3211-3221.
- Raftopoulou M, Hall A (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*, **265**, 23-32.
- Rainger GE, Fisher AC, Nash GB (1997). Endothelial-borne platelet-activating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils. *American Journal of Physiology*, **272**, 114-122.
- Rao KMK (2001). MAP kinase activation in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, **69**, 3-10.
- Rebecchi MJ, Pentylala SN (2000), Structure, function, and control of phosphoinositide-specific Phospholipase C. *Physiological Reviews*, **80**, 1292-1324.
- Romeo V, Ziino M, Giuffrida D, Condurso C, Verzera A (2007). Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS. *Food Chemistry*, **101**, 1272-1278.
- Rosales JL, Ernst JD (1997). Calcium-dependent neutrophil secretion: characterization and regulation by annexins. *Journal of Immunology*, **159**, 6195-6202.
- Rossi D, Zlotnik A (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annals of Reviews Immunology*, **18**, 217-242.
- Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH (2003), Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of Leukocyte Biology*, **73**, 30-48.
- Satyanarayana T, Mathews AA, Vijetha P (2008). phytochemical and pharmacological Review of Some Indian Capparis Species. *Pharmacognosy Reviews*, **2**, 36-45.
- Seely JEA, Pascual JL, Christou NV (2003). Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Critical Care*, **7**, 291-307.
- Seidel V (2005). Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 27-37.
- Selloum L, Reichl S, Müller M, Sebihi L, Arnold J (2001). Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **395**, 49-56.
- Setty AR, Sigal LH (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.
- Sergeant S, McPhail LC (1997). Opsonized zymosan stimulates the redistribution of protein kinase C isoforms in human neutrophils. *Journal of Immunology*, **159**, 2877-2885.

- Sharaf M, El-Ansari MA, Saleh NAM (2000). Quercetin triglycoside from *Capparis spinosa*. *Fitoterapia*, **71**, 46–49.
- Shen L, Smith JM, Shen Z, Eriksson M, Sentman C, Wira CR (2007). Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor- β 1. *Clinical and Experimental Immunology*, **149**, 155–161.
- Sisson JH, Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA (1987). Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B₄ metabolism. *Journal of Immunology*, **138**, 3918-3926.
- Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC (1989). Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, **83**, 2008-2017.
- Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne H R (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P₃ and polarity during neutrophil chemotaxis. *Journal of Cell Biology*, **160**, 375-85.
- Steeber DA, Campbell MA, Basit A, Ley K, Tedder TF (1998). Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 7562-7567.
- Steenkamp V, Mathivha E, Gouws MC, van Rensburg CEJ (2004). Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, **95**, 353-357.
- Stewart M, Hogg N (1996). Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs avidity. *Journal of Cellular Biochemistry*, **61**, 554-561.
- Su X, Duan J, Jian Y, Shi J, Kakuda Y (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition Anal*, **19**, 348-353.
- Suzuki T, Hazeki O, Hazeki K, Ui M, Katada T (1996). Involvement of the beta gamma subunits of inhibitory GTP-binding protein in chemoattractant receptor-mediated potentiation of cyclic AMP formation in guinea pig neutrophils. *Biochimistry Biophysics Acta*, **1313**, 72-78.
- Symons M, Settleman J (2000). Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends cell Biology*, **10**, 415-9.
- Tesoriere L, Butera D, Gentile C, Livrea MA (2007). Bioactive components of caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and Antioxidant Effects in a Red Meat Simulated Gastric Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 8465–8471.
- Tordera M, Ferranandiz ML, Alcaraz MJ (1994). Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. *Journal of Biology Science*, **49**, 235-240.

- Tozeren A, Ley K (1992). How do selectins mediate leukocyte rolling in venules? *Biophysics Journal*, **63**, 700-709.
- Trombetta D, Occhiuto F, Perri D, Puglia C, Santagati NA, Pasquale AD, Saija A, Bonina F (2005). Antiallergic and antihistaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* L. flowering buds. *Phytotherapy Research*, **19**, 29–33.
- Tuluc F, Garcia A, Bredeteau O, Meshki J, Kunapuli SP (2004). Primary granules release from human neutrophil is potentiated by soluble fibrinogen through a mechanism depending on multiple intracellular signalling pathways. *American Journal of Physiology. Cell physiology*, **287**, C1264–C1272.
- Van Buul JD, Hordijk PL (2004). Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular*, **24**, 824-833.
- Van der Flier A, Sonnenberg A (2001). Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*, **305**, 285-298.
- Van der Vieren M, Crowe DT, Hoekstra D, Vazeux R, Hoffman PA, Grayson MH, Bochner BS, Gallatin WM, Staunton DS (1999). The leukocyte integrin alpha D beta 2 binds VCAM-1: evidence for a binding interface between I domain and VCAM-1. *Journal of Immunology*, **163**, 1984-1990.
- Van der Vieren M, Le Trong H, Wood CL, Moore PF, St John T, Staunton DS, Gallatin WM (1995). A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity*, **3**, 683-690.
- Van Haaster PJM, Devreotes PN (2004). Chemotaxis: Signalling the way forward. *Molecular Cell Biology*, **5**, 626-634.
- Vestweber D (2002). Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 587-593.
- Vocks A, Petkovic M, Arnold J (2003). Involvement of phosphatidic acid in both degranulation and oxidative activity in fMet-Leu-Phe stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **13**, 165-172.
- Vonkeman HE, Laar MAV (2008). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Adverse Effects and their Prevention. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **10**, 10-16.
- Wagner JG, Roth RA (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacological Reviews*, **52**, 349-374.
- Wanikiat P, Panthong A, Sujayanon P, Yoosook C, Rossi AG, Reutrakul V (2008). The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**, 234-244.
- Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, Campbell ID (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*, **128**, 171-182.

- Weiner OD, Servant G, Welch MD, Mitchison TJ, Sedat JW, Bourne HR (1999). Spatial control of actin polymerization during neutrophil chemotaxis. *Nature Cell Biology*, **1**, 75-81.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Hilbwegs-Macarelli L (2000). Neutrophils : Molecules , function and pathological aspects. *Laboratory Investigation*, **80**, 617-653.
- Zarbock A , Ley K (2008). Biological perspectives: mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American Journal of Pathology*, **172**, 1-7.
- Zlotnik A, Yoshie O (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, **12**, 121-127.

Résumé

L'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques (E-Met) et aqueux (E-Aq) des bourgeons floraux et des feuilles de *Capparis spinosa* a été étudiée *in vitro* dans la présente étude. Le potentiel anti-inflammatoire des extraits est évalué par l'investigation de leurs effets sur la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles humains. L'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles stimulés par le formyl-Met-Leu-Phe/ cytochalasine B (fMLP/CB), ou par le zymosan opsonisé (ZOP) par le sérum humain est exploitée pour estimer la dégranulation de ces cellules, alors que la migration des neutrophiles induite par l'fMLP est étudiée à l'aide d'une chambre de chimiotactisme (48-micro well chemotaxis chamber). Les résultats obtenus montrent que la dégranulation des neutrophiles activés par le fMLP /CB ou par le ZOP est significativement ($p<0,05$) inhibée et d'une manière concentration-dépendante par l'E-Met des bourgeons et des feuilles de la plante. Dans le cas des neutrophiles fMLP/CB-stimulés, cette inhibition est de 67% et 65% à 100 µg/ml de l'E-Met des bourgeons et feuilles respectivement, cependant, dans le cas des neutrophiles stimulés par le ZOP l'inhibition est de 43%, 40% respectivement. De même, ces deux extraits ont exercé un effet inhibiteur important sur la migration des neutrophiles vers l' fMLP avec des IC_{50} de 56,25 µg/ml et 51,25 µg/ml respectivement. D'autre part, les E-Aq des deux parties de la plante à 50 µg/ml ont exercé une inhibition faible (20%) mais significative ($p<0,05$) sur la dégranulation des neutrophiles-fMLP/CB stimulés, sans affecter la dégranulation induite par le ZOP. L'extrait aqueux des bourgeons floraux et des feuilles du câprier a présenté un effet inhibiteur remarquable avec des IC_{50} de 75,55 µg/ml et 63,67 µg/ml respectivement sur le chimiotactisme des neutrophiles vers l'fMLP.

Mots clés : Neutrophile, Dégranulation, Chimiotactisme, *Capparis spinosa*, Anti-inflammatoire.

ملخص

قَدِّر في هذه الدراسة الفعل المضاد للالتهاب لكل من المستخلص الميثانولي (E-Met) والمائي (E-Aq) لأوراق وبراعم أزهار نبتة الكبار *Capparis spinosa*، وذلك عن طريق اختبار تأثيرها على إفراز حبيبات الخلايا المتعادلة للإنسان المحفزة بـ fMLP/CB أو Zymosan opsonisé (ZOP). كما أُختبر أيضاً تأثير هذه المستخلصات على الهجرة الموجهة لهذه الخلايا نحو عامل الجذب الكيميائي fMLP. بينت النتائج أن لـ E-Met لكل من الأوراق والبراعم تأثيراً مثبطاً معنوياً ($p < 0.05$) متعلقاً بالتركيز على إفراز الحبيبات مع كلا المحفزين، والذي يتراوح بين 65% و 67% في حالة الخلايا المحفزة بـ fMLP/CB وبين 40% و 43% في حالة الخلايا المحفزة بـ ZOP عند تركيز 100 ميكروغرام/ملل. بالإضافة إلى ذلك أظهر E-Met للأوراق والبراعم تأثير مثبطاً معنوياً معتبراً على هجرة الخلايا المتعادلة نحو fMLP. قدر التركيز المثبط لـ 50% من الهجرة (IC_{50}) بـ 51.25 و 56.25 ميكروغرام/ملل على التوالي. من جهة أخرى، تبين أن لـ E-Aq للأوراق والبراعم تأثيراً مثبطاً ضعيفاً (20%)، لكنه معنوياً على إفراز حبيبات الخلايا المتعادلة المنشطة بـ fMLP/CB، دون أن يؤثر على إفرازها في حالة التنشيط بـ ZOP. كما ثبتت الهجرة الموجهة للخلايا المتعادلة نحو fMLP تشبيهاً ملحوظاً وقدر التركيز المثبط لـ 50% من الهجرة الموجهة بـ 63.67 و 75.55 ميكروغرام/ملل على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الخلايا المتعادلة، إفراز الحبيبات، الهجرة الموجهة، *Capparis spinosa*، مضادات الالتهاب.

Abstract

The anti-inflammatory activity of the methanolic and aqueous extracts of flower buds and leaves of *Capparis spinosa* were investigated in this study. The anti-inflammatory potential was evaluated by testing the effects of these extracts on neutrophil degranulation stimulated by formyl-Met-Leu-Phe/cytochalasine B (fMLP/CB) or by opsonized zymosan (ZOP) and chemotaxis induced by fMLP. Neutrophil degranulation was measured using elastase release as a marker, while the neutrophil migration was studied using 48-micro well chemotaxis chamber. Results revealed that the degranulation was significantly ($p<0,05$) inhibited by the methanolic extracts. Effectively, at 100 µg/ml of flower buds and leaf extracts, the inhibitions were 67% and 65% respectively in fMLP/CB-stimulated neutrophil, however, in opsonized zymosan activated neutrophils, the inhibitions were 43%, 40% respectively. In the same way, the treatment of neutrophils with these two extracts represent a strong inhibitory effect on their chemotactic toward fMLP with IC_{50} of 56.25 µg/ml and 51.25 µg/ml for the flower buds and the leaves respectively. On the other hand, at 50 µg/ml, the aqueous extract of the two parts of the plant inhibited weakly (20%) but significantly ($p<0.05$) the degranulation of neutrophil-fMLP /CB stimulated. No effect was showed on the deganulation of the opsonized zymosan-neutrophil activated. Moreover, these two extracts showed an important inhibitory effect on the chemotaxis of the neutrophil toward fMLP with IC_{50} of 75.55 µg/ml and 63.67 µg/ml respectively.

Key words: Neutrophil, Degranulation, Chemotaxis, *Capparis spinosa*, Anti-inflammatory.