



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université de Tissemsilt
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme
de Master académique en

Filière : **Biologie**

Spécialité : **Biochimie Appliquée**

Présentée par :

- **BENCHIKO Boualem Abdelmalek**
- **BENLACHEHEB Ahmed Abdelkhalek**

Thème

**Evaluation de l'effet anti inflammatoire d'un
produit naturel supplémenté de produits de la
ruche**

Soutenu le, 15/06/2021.

Devant le Jury :

MERZOUK H	Président	Prof	Univ-Tlemcen
IMESSAOUDENE A	Encadreur	M.C.B.	Univ Tissemsilt
CHAHBAR M	Co-encadreur	M.C.B.	Univ-Tissemsilt
GADOUM A	Examineur	M.A.B.	Univ-Tissemsilt

Année universitaire : 2020-2021

Nous voudrions dans un premier temps remercier notre encadrante, Dr Asmahian IMESSAOUDENE et co-encadrant Dr Mohamed CHAHBAR qui nous ont fait l'honneur de veiller et diriger ce travail.

Nous avons le privilège d'être encadrées et orientées par elle d'apprécier ses qualités et des valeurs et pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury le président Professeur H. MERZOUK de l'université de Tlemcen et l'examineur Docteur GADOUM Abdelkader pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons à témoigner tous les collègues qui nous ont accompagnés dans le laboratoire, en particulier nous tenons à les remercier profondément Mr Mohamed LAFFER ingénieur du laboratoire de pédagogies de la faculté de Science et Technologie supplément Département de Science de Nature et de Vie, pour l'attention qu'ils ont porté à ce travail et leur disponibilité et bien sûr de ne pas oublier nos parents, pour leurs soutiens constants et leurs encouragements.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leur générosité et la grande patience sont-ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce projet:

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE :

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour

A MON TRÈS CHER PÈRE :

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.

A MES SOEURS :

Qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études

A MA FIANCÉE:

Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler.

Tu me voulais toujours le meilleur

Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés,

Je te remercie de ne m'avoir jamais déçu

*A ma famille, mes proches et ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité
Mes chers amis qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.*

Ahmed

Dédicace

Je dédie ce projet :

A mon cher père décédé mes efforts, mes années d'études et ma réussite malgré son absence. Combien je te souhaite ici et que dieu vous fasse miséricorde. Reste en paix,

A ma chère mère qui m'a soutenu et encouragé durant ses années d'études.

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mon frère qui a partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail, il m'a chaleureusement soutenu et encouragé tout au long de mon parcours.

*A ma famille, mes proches et ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité
Mes chers amis qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès.*

Boualem

Liste des figures

Figure 1 : mécanisme de l'inflammation	04
Figure 2 : appendice d'un enfant de 10 ans aigue	05
Figure 3: mécanisme d'action de sélectivité et non sélectivité d'anti inflammatoire non stéroïdien	09
Figure 4 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique, la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle	18
Figure 5: l'effet anti-hémolytique (stabilité de la membrane des globules rouge) entre l'acide gallique, le Diclofénac et la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle	20
Figure 6 : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle.	22

Liste des tableaux

Tableau A1.a : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique, la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de cire naturelle	37
Tableau A1.b : analyse descriptive de test de cytotoxicité	37
Tableau A2.a : l'effet anti-hémolytique (stabilité de la membrane des globules rouge) entre l'acide gallique, le Diclofénac et la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle	37
Tableau A2.b : analyse descriptive de test anti hémolytique	37
Tableau A3.a : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle.	38
Tableau A3.b : analyse descriptive de test anti inflammatoire	38

Liste des abréviations

AGMI : Acide gras monoinsaturés

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

COX: Cyclooxygenase

CRP : C-Reactive Protein

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DEM : Deltaméthrine

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EVOO : Huile d'olive extra vierge

GRh : Globules rouges humaine

IFN : Interféron

IL : Interleukin

LPS: Lipopolysaccharides

NF-B: Nuclear factor of activated B cells

NOS: Nitric oxide synthase

OFE: Extrait éthanolique d'olive

OLE: Oleuropéine

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PAF : Facteur d'activation plaquettaire

PG: Prostaglandine

ROS: Reactive oxygen species

RPM: Revolutions Per Minute

SAP: Serum Amyloid-P

SBA: Sérum bovine albumin

TNF: Tumor necrosis factor

UV: Ultraviolet

Sommaire

I. Introduction	1
II. Rappels bibliographique	3
1- Inflammation.....	3
2- Médiateurs d'inflammation	5
3- Mise en place d'une réponse inflammatoire contre un pathogène	7
4- Le traitement et pistes thérapeutiques d'inflammation	7
1- Les anti inflammatoires	7
a. Corticoïdes	7
b. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens	8
2- Traitements plus ciblés : les Biothérapies	8
5- L'inflammation par dénaturation de protéines.....	9
6- Hémolysé	10
III. Matériel et methods	13
1- Préparation des solutions de la crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire naturelle de l'abeille domestique.....	13
2- Détermination, in vitro, de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire de la crème	13
a. Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRH)... ..	13
b. Test de cytotoxicité	14
c. Évaluation de l'activité anti-hémolytique.....	14
d. Évaluation de l'activité Anti-inflammatoire	15
IV. Résultats et interprétation	17
1- Etude des activités biologiques in vitro de la crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire d'abeille.....	17
a. Test de cytotoxicité	17
b. Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges)	19
c. Test anti –Inflammatoire de la crème à base d'huile d'olive, des extraits des plantes et de cire d'abeille	21
V. Discussion	23
VI. Conclusion	29
VII. Références bibliographique	30
VIII. Annexes	37

Introduction

L'inflammation est une réaction biologique causée par la perturbation de l'homéostasie tissulaire, se produisant en réponse à la présence d'un agent biologique, chimique ou physique dans le corps. Certains de ces agents peuvent être des agents pathogènes (bactéries, champignons et virus), des traumatismes (choc ou brûlures), des composés toxiques (polluants), ainsi que des réactions du système immunitaire (hypersensibilité) (**Ambriz-Pérez et al., 2016**).

Les lésions tissulaires induites par ce traumatisme entraînent la libération de médiateurs inflammatoires dont les cytokines et le facteur de nécrose tumorale (TNF-), l'interleukine-1 (IL-1) à partir des leucocytes, des monocytes et des macrophages; les cytokines déclenchent en outre la régulation à la hausse d'autres cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, les immunoglobulines, et augmentent l'expression de nombreuses molécules d'adhésion cellulaire (**Iwalewa et al., 2007**).

La prise en charge des troubles inflammatoires implique l'utilisation de différentes classes de médicaments tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les corticostéroïdes (**Elisha et al., 2016 ; Rahmani et al., 2016**).

En raison de leur efficacité à réduire la douleur et l'inflammation, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont parmi les médicaments les plus couramment utilisés, confirmant leur position dans la liste modèle des médicaments essentiels de l'OMS (**Bindu et al., 2020**).

L'utilisation d'AINS a des effets indésirables cardiovasculaires, hépatiques, rénales, cérébrales, pulmonaires et gastro-intestinaux, notamment une irritation de la muqueuse gastrique, des éructations, des ulcérations gastriques et des saignements (**Bindu et al., 2020 ; Elisha et al., 2016**).

Comme alternative au traitement de l'inflammation, il y a l'utilisation de plusieurs plantes et herbes avec des effets secondaires minimes ou nuls, les composés phénoliques étant l'un de leurs principaux composants. Les composés phénoliques sont capables d'inhiber soit la production soit l'action de médiateurs pro-inflammatoires, ce qui entraîne une capacité anti-inflammatoire (**Ambriz-Pérez et al., 2016**).

Diverses herbes ont été identifiées comme possédant des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, et certaines d'entre elles sont actuellement utilisées pour traiter les troubles inflammatoires et les troubles causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Kaplan et al., 2007**).

Plusieurs préparations à base de plantes ont été considérées comme utiles dans le traitement des troubles inflammatoires induits par les ROS comme : l'ail (*Allium Sativum*) élimine les radicaux hydroxyles, inhibe l'activation de NF-B dans les cellules T, inhibe la production de

NO en supprimant l'ARNm iNOS et l'expression des protéines et curcuma (*Curcuma longa*) : Protège les lipides de la peroxydation et est un puissant piègeur de plusieurs ROS, inhibe l'expression du gène iNOS induite par le LPS dans les macrophages péritonéaux murins cultivés ex vivo, éventuellement en diminuant le TNF et l'IL-1 et inhibant l'activation de NF- κ B, élimine directement le NO et inhibe la synthèse de prostaglandines et de leucotriènes pro-inflammatoires en inhibant l'absorption d'acide arachidonique par les macrophages (**Kaplan et al., 2007**).

Les propriétés anti-inflammatoires de plusieurs phytomédicaments, qui contiennent des substances comme les phytoestrogènes, les flavonoïdes et ses dérivés, le phytostérol, le tocophérol, l'acide ascorbique, la curcumine, la génistéine et d'autres peuvent être les inhibiteurs des cibles moléculaires des médiateurs pro-inflammatoires dans les réponses inflammatoires (**Iwalewa et al., 2007**). Certains des organismes et facteurs responsables de l'initiation et de la promotion de l'inflammation pourraient être éliminés ou neutralisés pour supprimer l'expression des agents pro-inflammatoires (**Iwalewa et al., 2007**).

L'objectif du présent travail de master est d'évaluer l'effet anti-inflammatoire d'une crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de cire naturelle d'abeille par la détermination in vitro de la cytotoxicité, ainsi que l'effet anti-hémolytique et anti-inflammatoire, afin de pouvoir l'utiliser comme traitement alternatif de l'inflammation.

Synthèse
Bibliographique

1- Inflammation

L'inflammation fait partie de la réponse immunitaire non spécifique qui se produit en réaction à tout type de blessure corporelle (**Ferrero-Miliani et al., 2007**). Les mots « infection » et « inflammation » sont souvent utilisés ensemble, mais ils ont des significations très différentes, l'infection est l'invasion d'agents pathogènes dans le corps, et l'inflammation est la réponse du corps pour se protéger contre l'infection (**Le personnel de sickkids hospital, 2013**).

L'inflammation implique des interactions complexes de médiateurs solubles, de cellules résidentes ainsi que de cellules infiltrantes et de molécules appartenant à la matrice extracellulaire. Une réponse inflammatoire réussie et contrôlée est un processus utile qui conduit à l'élimination des stimuli nuisibles et restaure une physiologie normale qui est régulée avec précision par une cascade moléculaire complexe (**Tasneem et al., 2018**).

L'inflammation se caractérise par une rougeur et une chaleur résultant d'une augmentation du flux sanguin, un gonflement résultant d'une augmentation de la perméabilité capillaire, qui provoque la fuite de protéines plasmatiques et de médiateurs cellulaires solubles de la circulation sanguine, et une douleur résultant de l'activation et de la sensation des fibres nerveuses afférentes primaires. Ces changements dans les tissus enflammés servent à tenter de réparer les dommages et de limiter la menace pour l'organisme (**Elgorashi et McGaw, 2019**).

L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé, les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète (**Rousselet et al., 2005**). Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation (**Rousselet et al., 2005**).

Indépendamment de la localisation et de la nature de l'agent pathogène, le processus de réponse inflammatoire présente des caractéristiques morphologiques générales et des mécanismes communs. Cependant, différentes étapes montrent des changements liés à la nature du pathogène, à l'organe dans lequel le pathogène se produit et à la topographie physiologique de l'hôte : tous ces facteurs affectent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel (**Rousselet et al., 2005**).

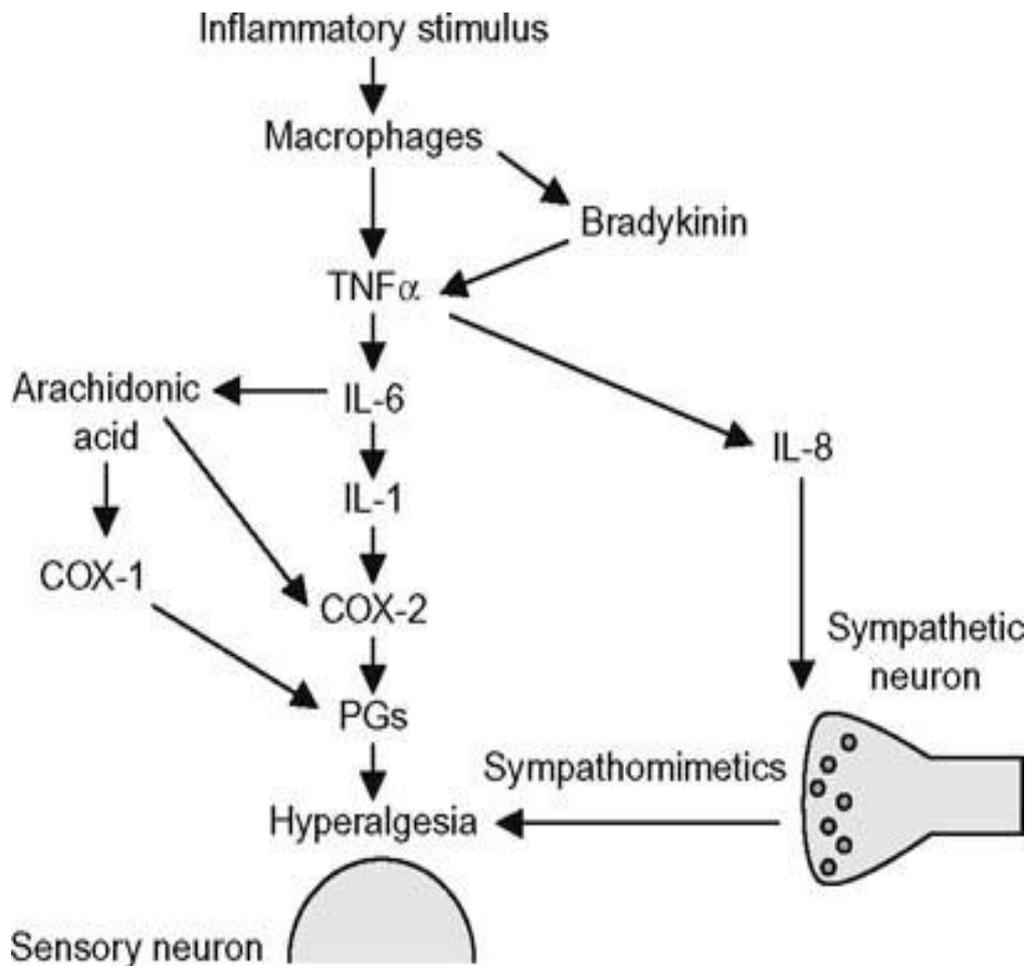


Figure 1 : mécanisme de l'inflammation (Botting et al., 2000)

D'après le type de stimulus et l'efficacité de la réaction pour éliminer ce stimulus ou les tissus blessés, l'inflammation peut être **aiguë** ou **chronique** (Ambriz-Pérez et al., 2016).

Inflammation aiguë, réponse normale de l'organisme permettant, généralement, une protection et une réparation (Schwartz K, 2011-2012).

La réaction inflammatoire est caractérisée par les 4 signes cardinaux de Celsius (1^{er} siècle) : « Rubor et tumor cum calore et dolore » (rougeur et gonflement avec chaleur et douleur). Quelques siècles plus tard, Galien y ajouta un 5^{ème} signe : « functio laesa » (perte de fonction) (Mélina Z, 2010).

L'inflammation aiguë commence rapidement (en quelques minutes) et sa durée est de quelques heures ou quelques jours, se caractérise par l'exsudation de protéines fluides et plasmatiques et une émigration des leucocytes (principalement des neutrophiles) (Ambriz-Pérez et al., 2016).

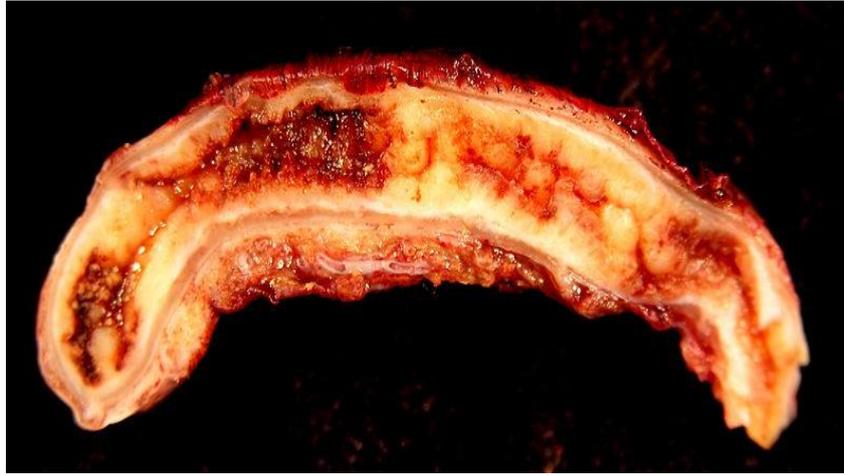


Figure 2 : appendice d'un enfant de 10 ans (Ed Uthman , 2007)

L'étendue de la réponse inflammatoire est d'une importance critique, car si l'inflammation aiguë ne parvient pas à réguler le stimulus pro-inflammatoire, cela entraîne une inflammation chronique, une auto-immunité et des lésions tissulaires excessives (Tasneem et al., 2018).

Inflammation chronique est une inflammation qui persiste dans le temps (plusieurs semaines, mois ou années), ce terme regroupe un ensemble d'aspects morphologiques différents résultants de stimuli et de mécanismes variés (Guedj et Bedossa, 2015).

Les principales caractéristiques de l'inflammation chronique sont : la persistance de la lésion tissulaire, la présence d'un infiltrat inflammatoire chronique (lymphocytes, plasmocytes, monocytes-macrophages, polynucléaires éosinophiles, basophiles, mastocytes) et l'existence d'une fibrose (Ambriz-Pérez et al., 2016 ; Guedj et Bedossa 2015)

2- Médiateurs de l'inflammation :

Les médiateurs sont les substances libérées sous forme de protéines plasmatiques ou qui proviennent de cellules telles que les mastocytes, les plaquettes, les neutrophiles et les monocytes/macrophages. Ils sont déclenchés par des irritations allergiques ou chimiques, des blessures et des infections (Iwalewa et al., 2007).

les macrophages, favorisent la production de médiateurs pro-inflammatoires. Ces médiateurs comprennent l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-6, l'IL-8, entre autres ; le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'oxyde nitrique (NO) et les prostaglandines (PG) (Ambriz-Pérez et al., 2016).

Ces médiateurs, en fonction de la durée de la lésion, déterminent la gravité de l'inflammation et sont appelés facteurs fondamentaux pro-inflammatoires. Ces substances se lient à des

récepteurs cibles spécifiques sur les cellules et peuvent augmenter la perméabilité vasculaire, favoriser la chimiotaxie des neutrophiles, stimuler la contraction des muscles lisses, augmenter l'activité enzymatique directe, induire la douleur et/ou provoquer des dommages oxydatifs (Iwalewa et al., 2007).

La surproduction de ces médiateurs dans l'inflammation chronique a été liée à l'apparition de maladies dégénératives chroniques telles que l'arthrite, l'athérosclérose, l'asthme, la maladie d'Alzheimer, le cancer, entre autres. Pour cette raison, ralentir le processus inflammatoire est devenu très important, à cette fin, des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont généralement utilisés (Ambriz-Pérez et al., 2016).

Les cytokines pro-inflammatoires (du grec « cyto » : cellules et « kinos » : mouvement) sont des petites protéines sécrétées par les cellules en réponse à divers stimuli. En termes de réponse immunitaire, ils permettent la communication entre les cellules immunitaires et déterminent le sens de la réponse en fonction de la nature du signal détecté (Mayol, 2021).

Autres médiateurs de l'inflammation

- *Les médiateurs lipidiques de l'inflammation* : leucotriènes, prostaglandines et facteur d'activation plaquettaire (PAF), ces composés sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les macrophages, et induisent aussi l'augmentation de la dilatation des vaisseaux et leur perméabilité, facilitant l'arrivée des leucocytes sur le site de l'inflammation (Mayol, 2021).

- *Les protéines de la phase aigüe* sont produites par les hépatocytes au moment de la phase aigüe de l'inflammation, les deux pentraxines **CRP** (C-Reactive Protein) et **SAP** (Serum Amyloid-P) sont de puissantes opsonines favorisant la phagocytose des pathogènes par les macrophages (Mayol, 2021).

- *Le système des kinines (Bradykinine)* est produite par l'activation du facteur Hageman (ou facteur XII) du système de coagulation lorsqu'il rencontre du collagène (le collagène est exposé lorsqu'il entre en contact avec le sang après désintégration du tissu endothélial tissulaire) après une lésion vasculaire (Mayol, 2021). Ce peptide est un agent vasoactif très efficace, qui peut induire une dilatation des veinules, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une contraction locale des muscles lisses, et favoriser le recrutement des leucocytes (Mayol, 2021).

3- Mise en place d'une réponse inflammatoire contre un pathogène

Selon **Schwartz (2012)**, trois séquences d'événements complexes et intriqués composent la réponse inflammatoire :

1. Une phase d'initiation (phase vasculaire) qui fait suite à un signal de danger exogène ou endogène et qui met en jeu une première série d'acteurs. Cette première phase varie en fonction du type d'agression (endogène, exogène) qu'a subit l'organisme ;
2. Une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'autres acteurs et
3. Une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

4- Le traitement et pistes thérapeutiques d'inflammation

4- 1- Les anti-inflammatoires :

La thérapie anti-inflammatoire contrôle l'excès de réaction aspécifique des tissus et prévient la transformation de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique, en raison de la grande variété de stimuli inflammatoires pouvant endommager l'organisme (immunité, microcristaux, infections, corps étrangers, traumatismes, etc.), les anti-inflammatoires sont utilisés dans tous les domaines de la pathologie. Ils appartiennent à des classes chimiques différentes les uns des autres et ont généralement une activité antipyrétique et analgésique périphérique supplémentaire. Leur mode d'action est purement symptomatique, car ils n'arrêtent généralement pas l'évolution de la maladie. L'inflammation n'est qu'une conséquence, et à notre connaissance, traiter sa cause est l'objectif principal des praticiens (**Muster, 2005**).

Les glandes surrénales secrètent de l'hydrocortisol qui participe au retour au calme en fin de réponse inflammatoire normale. Dans le cas de réaction inflammatoire chronique, on utilise différents types d'anti-inflammatoires : les corticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (**Schwartz, 2012**).

a. Les corticoïdes : La corticothérapie par voie générale constitue le traitement de première intention de nombreuses maladies inflammatoires, du fait de ses propriétés anti-inflammatoires puissantes et de son effet immunosuppresseur global. Il s'agit des traitements prescrits en première ligne pour calmer l'inflammation en cas de crise. Les choix du médicament et de sa voie d'administration dépendent de l'intensité des symptômes et de leur localisation dans le système digestif (**Schwartz, 2012**).

b. Les Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) produisent leurs activités thérapeutiques par l'inhibition de la cyclooxygénase (COX), l'enzyme qui fabrique les prostaglandines (PG). Ils

partagent, à un degré plus ou moins grand, les mêmes effets secondaires, y compris la toxicité gastrique et rénale. Récemment la recherche a montré qu'il existe au moins deux COX isoenzymes. COX-1 est constitutif et fait des PG qui protègent l'estomac et les reins contre les dommages. COX-2 est induits par des stimuli inflammatoires, tels que les cytokines, et produit des PG qui contribuent à la douleur et à l'enflure des inflammations. Ainsi, les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 devraient être anti-inflammatoires sans effets secondaires sur les reins et estomac. Bien entendu, les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 peuvent avoir d'autres effets secondaires et peut-être d'autres potentiels thérapeutiques. Pour exemple, la COX-2 (et non la COX-1) serait impliquée pendant l'ovulation et le travail (figure 03). De plus, le bien connu. L'action protectrice de l'aspirine sur le cancer du côlon peut être due à une action sur la COX-2, qui s'exprime dans cette maladie. De plus, les AINS retardent la progression de la maladie d'Alzheimer (Vane et Botting, 1998).

4-2 Traitements plus cibles : les Biothérapies

- La connaissance des mécanismes de l'inflammation permet d'envisager de cibler plus directement des acteurs de la réaction inflammatoire afin de limiter, autant que possible, les effets secondaires des traitements (Schwartz, 2012).
 - **Les anti-inflammatoires d'origine végétale**
- Le nombre des composés phyto-chimiques trouvés dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phyto-chimiques ont des propriétés anti-inflammatoires, beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase (Guemra et Mecherour, 2018).

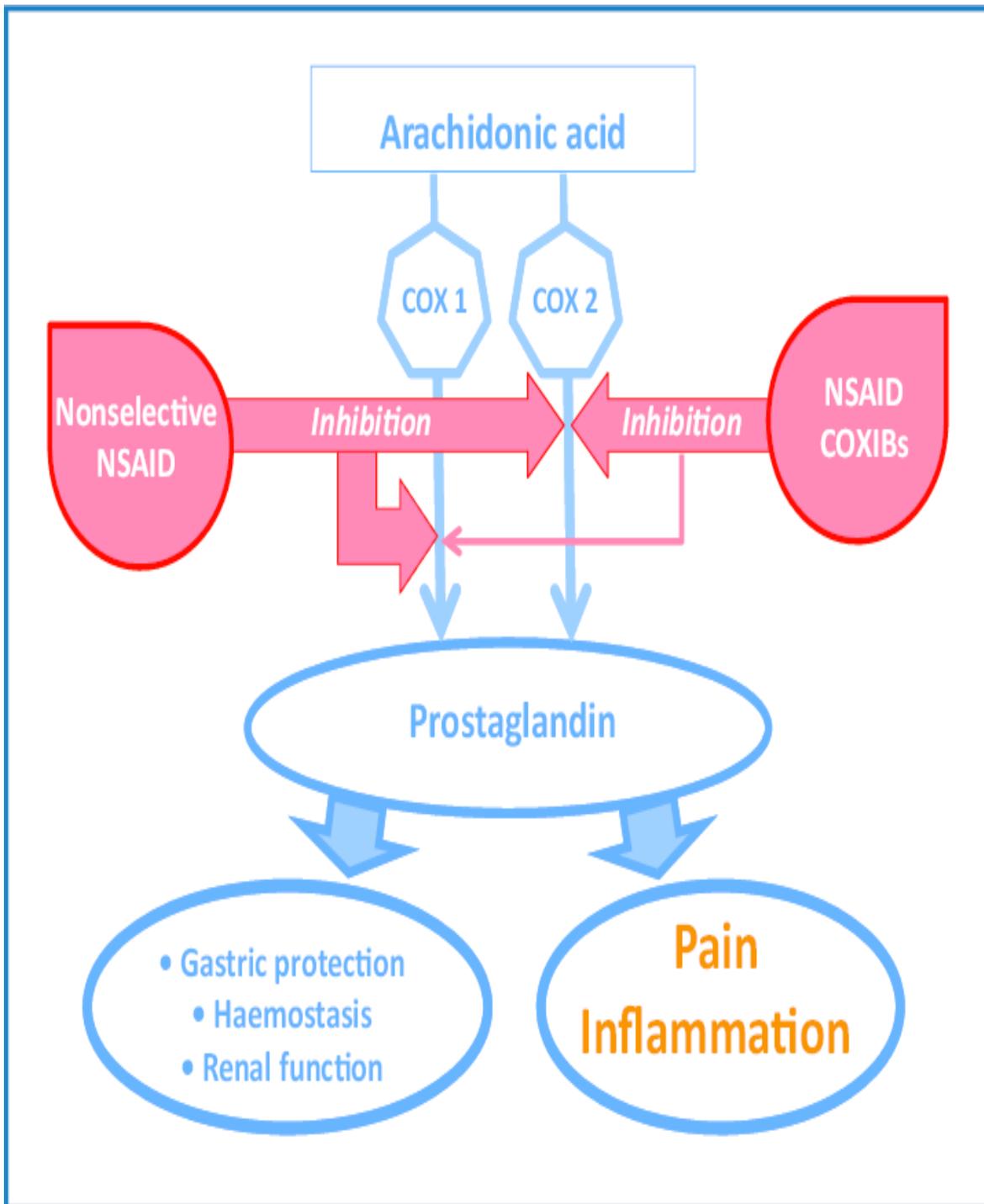


Figure 3 : mécanisme d'action de sélectivité et non sélectivité d'anti inflammatoire non stéroïdien (Slim et al., 2016)

L'inflammation par dénaturation des protéines :

La dénaturation des protéines a été déterminée comme la cause de l'inflammation, les indications sont que lorsque les tissus vivants sont blessés, une inflammation se produit (Bailey-Shaw et al., 2017). un nombre significatif d'anti inflammatoires sont connus pour inhiber la dénaturation de protéines (Pungle et al., 2018). La plupart des protéines perdent

leurs fonctions biologiques lorsqu'elles sont dénaturées (**Marliyah et Ananthi, 2015**). Dans le corps, la dénaturation des protéines peut être l'origine des auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques, telles que la polyarthrite humatoïde (**Mizushima et Kobayashi, 1968 ; Chandra et al., 2012**). De plus, un ensemble complexe d'activation enzymatique, de libération de médiateurs, de migration cellulaire, de dégradation et de réparation des tissus se produit, provoquant la perte de la conformation moléculaire et des fonctions de la protéine ou sa dénaturation (**Bailey-Shaw et al., 2017**).

5- L'hémolyse :

L'hémolyse est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits, libérant ainsi l'hémoglobine dans le milieu extérieur (**Achab, 2020**).

La destruction des érythrocytes est un phénomène normal qui a lieu dans la rate lorsque les globules rouges, en fin de vie, y sont détruits et éliminés. L'hémolyse anormale du sang peut avoir différentes causes. Il peut s'agir d'une pathologie qui aboutit à la destruction des globules rouges dans les vaisseaux sanguins (exemples : certaines anémies, accidents transfusionnels, paludisme, etc.) (**Preynat et al., 2010**).

En milieu hypotonique, l'hémolyse s'explique par des changements conformationnels ou associatifs des protéines membranaires aboutissant à la formation des pores et à une hémolyse ultérieure et à la diffusion de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire (**Manaargadoo-Catin et al., 2016**).

La membrane érythrocytaire ressemble à la membrane lysosomale en tant que telle, l'effet des médicaments sur la stabilisation des érythrocytes pourrait être extrapolé à la stabilisation de la membrane lysosomale (**James et Nnacheta, 2008**).

La présence d'hémoglobine libre dans les milieux de suspension des globules rouges comme le plasma ou les solutions additives est une indication généralement de l'hémolyse des globules rouges (**Sowemimo-Coker, 2002**).

Les humains ont commencé la recherche de divers moyens, y compris les plantes, pour contrôler et gérer l'inflammation depuis des temps immémoriaux. De nombreuses espèces végétales ont une activité anti-inflammatoire in vitro (**Elgorashi et McGaw., 2019**).

Le continent africain abrite environ 74 000 espèces de plantes à fleurs, parmi celles-ci, seules 408 espèces végétales, appartenant à 79 familles de plantes, ont été rapportées comme possédant une activité anti-inflammatoire in vitro, représentant seulement 0,6% de la flore africaine totale (**Elgorashi et McGaw., 2019**). Cependant, 56,5% des espèces végétales à activité anti-inflammatoire in vitro appartiennent à seulement huit familles, à savoir les Xanthorrhoeaceae (14,4%) Légumineuses (7,3%), Asteraceae (6,3%), Malvacées (6,1%),

Combretaceae (5,8%) , Lamiacées (5,1%), Asparagacées (4,9%) et Rubiacées (3,1%). Cela n'est pas surprenant car les légumineuses, les astéracées et les rubiacées sont les plus grandes familles d'Afrique subsaharienne et tropicale. Les genres d'intérêt comprennent Aloe (Xanthorrhoeaceae, 56 espèces), Combretum (Combretaceae, 22 espèces), Hermannia (Malvaceae, 13 espèces) et Eucomis (Asparagaceae, 10 espèces) (**Elgorashi et McGaw., 2019**).

Le gingembre (*Zingiber officinalis*) contient des composés aux propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes comme le gingérol, les paradols et le shogaol. En fait, le gingembre contient plus de 100 principes actifs, c'est pour cette raison qu'il est particulièrement efficace pour soulager les douleurs causées par l'arthrite et autres rhumatismes inflammatoires (Anh et *al.*, 2020). Le gingembre peut réduire les marqueurs de l'inflammation tels que le TNF- α et l'interleukine 1 β (**Mozaffari-Khosravi et al., 2016**).

L'huile d'olive est l'un des aliments les plus représentatifs du régime méditerranéen traditionnel et un élément clé associé à ses effets protecteurs pour la santé. Des études épidémiologiques indiquent une association inverse entre la consommation d'huile d'olive et la survenue de différents types de cancer, de facteurs de risque cardiovasculaire, de processus liés à l'âge, de troubles inflammatoires chroniques et de maladies inflammatoires de l'intestin (**Di Nunzio et al., 2018**). Ces bienfaits pour la santé sont principalement attribués à la classe phénolique, où l'oleuropéine, le tyrosol et leurs dérivés sont les principaux constituants et représentent environ 90% de la teneur totale en phénols d'une huile d'olive vierge (**Di Nunzio et al., 2018**).

L'huile d'olive extra vierge a montré une activité anti-inflammatoire remarquable due à l'oléocanthal, un composé présent dans l'huile d'olive extra vierge qui a un profil remarquablement similaire à l'ibuprofène (un médicament anti-inflammatoire synthétique) (**Guemra et Mecherour, 2018**).

Selon **Ciceral et al., (2012)**, la consommation d'huile d'olive extra vierge (EVOO) par les populations méditerranéennes, et plus particulièrement les composés phénoliques naturellement présents dans l'EVOO. Des études impliquant des humains et des animaux (in vivo et in vitro) ont démontré que les composés phénoliques de l'huile d'olive ont des effets biologiques potentiellement bénéfiques résultant de leurs activités antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires.

Divers systèmes de dosage in vitro ont été utilisés pour cribler des extraits de plantes et des constituants de plantes actives pour une activité anti-inflammatoire. L'enzyme COX-1 a été

largement utilisée comme outil pour étudier les effets anti-inflammatoires d'extraits de plantes et de produits naturels (**Elgorashi et McGaw., 2019**).

D'autres systèmes d'essais biologiques ciblant d'autres médiateurs inflammatoires tels que la production d'oxyde nitrique, l'oxyde nitrique synthase inductible, le facteur nucléaire kappa-light-chain-enhancer des cellules B activées (NF- κ B) et divers médiateurs pro-inflammatoires tels que les interleukines (IL), les tumeurs le facteur de nécrose- α (TNF- α) et l'interféron (IFN) ont été utilisés, dans une moindre mesure, pour cribler des extraits de plantes pour une activité anti-inflammatoire (**Elgorashi et McGaw., 2019**).

La majorité des études consacrées au criblage in vitro d'extraits de plantes pour l'activité anti-inflammatoire ont suivi des pistes ethnobotaniques. Les plantes traditionnellement utilisées pour traiter la douleur, la fièvre et l'enflure du corps sont le premier choix d'investigation. D'autres critères de sélection tels que la chimiosystématique, la disponibilité ou la sélection aléatoire ont également été utilisés (**Elgorashi et McGaw., 2019**).

Matériel
et
Méthodes

L'étude expérimentale est réalisée au niveau du laboratoire de la Faculté des Sciences et de la technologie, Université de Tissemsilt.

1- Préparation des solutions de la crème à base d'huile d'olive, des graines de plante médicinales et de la cire naturelle de l'abeille domestique:

La crème utilisée dans cette étude provient d'un fabricant local de la région de Tissemsilt. Elle est faite d'un mélange d'huile d'olive pure, de la poudre des graines de plantes médicinales obtenue après séchage et broyage et de la cire naturelle de l'abeille domestique. Le mélange obtenu est homogène est de texture crémeuse.

Sur la base des observations et le témoignage des personnes ayant essayé la crème comme anti-inflammatoire, on a choisi cette crème. L'objectif de notre travail est de tester l'effet anti-inflammatoire de la crème *in vitro*.

Dans notre étude, on a l'autorisation d'exploiter la crème pour des fins scientifiques sans dévoiler la composition exacte de la crème dans ce mémoire pour des raisons commerciales. Nous tenant à préciser que les enseignants encadrant de ce travail ont la composition complète de la crème.

Les solutions de la crème à différentes concentrations sont préparées. Toutes les solutions ont été fraîchement préparées avant les expériences et utilisées immédiatement. La crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire naturelle a été dissoute dans du DMSO 0,5 % / d'eau physiologique de sorte que la quantité finale de DMSO était inférieure à 1 %. L'acide gallique et le diclofénac sodique sont dissous dans le même solvant (DMSO 0,5 % / d'eau physiologique normale).

2- Détermination, *in vitro*, de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire de cette crème:

a- Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh) :

Dans des tubes héparinés, des échantillons de sang frais (environ 4 ml) ont été récupérés, au niveau de laboratoire d'analyse médicale, où la prise de sang a été effectuée, sur des volontaires (20-30 ans).

Les différents échantillons de sang humain récupérés sont centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min, afin d'éliminer le plasma et les cellules polynucléaires.

Ensuite, le culot de GRh est lavé trois fois, avec un volume équitable de solution iso-saline, par la suite, reconstitution des suspensions de 10% (v/v) (GRh), avec une solution iso-saline et utilisé immédiatement.

b- Test de cytotoxicité :

Le principe de ce test est de mettre en contact des hématies avec la crème, à différentes concentrations, dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine (Hb) libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de la crème, vis-à-vis, des GRh.

- Mode opératoire :

Le protocole utilisé est celui de Bulmus et ses collaborateurs (2003), où un volume de 1.6 ml de la solution de la crème à base d'huile d'olive, graines de plante médicinales et de la cire naturelle ou de l'acide gallique (molécule de référence (polyphénol)) à différentes concentrations (0.4, 0.3, 0.2, et 0.15 mg/ml) est mélangé avec un volume de 0.4 ml de la suspension de GRh à (10%).

- Deux contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution de notre crème avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec de l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100% d'hémolyse).

- Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C, pendant 30 min, ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min et l'absorbance de l'Hb libérée a été mesuré à 560 nm.

- Expression des résultats :

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\%d'hémolyse = (At/Ac) \times 100$$

Où : Ac = Absorbance du contrôle ; At = Absorbance du test.

c- Evaluation de l'activité anti-hémolytique :

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité de la crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire naturelle à empêcher l'hémolyse des GRh induite par l'hypotonie et la chaleur et donc prévenir la libération de l'Hb.

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par (Sadique et al, 1989 ; oyedapo et al, 2010).

- Mode opératoire :

Le milieu réactionnel contenant 0,5 ml de la solution de notre crème ou du Diclofénac sodique ou l'acide gallique à différentes concentrations (0,4, 0,3, 0,2, 0,15 et 0,1 mg/ml), mélangé avec 1,5mL du tampon phosphate (pH=7,4) et 2ml d'une solution hypo-saline (0,36% NaCl), le tout incubé à 37°C pendant 20 min. Ensuite 0,5 ml de la suspension de GRh (10%) sont ajoutés à chaque concentration et une deuxième incubation est réalisée à 56°C pendant 1h.

A la fin, les tubes sont refroidis sous l'eau courante et suivis par une centrifugation à 2500 rpm pendant 5min. Les absorbances des surnageants sont mesurées à 560 nm. En parallèle, un contrôle est réalisé en remplaçant l'extrait avec 0,5 ml du tampon phosphate.

- Expression des résultats :

Le pourcentage de stabilité membranaire est estimé à partir de l'expression suivante :

$$\% \text{ de stabilité membranaire} = (Ac - At / Ac) \times 100$$

Où : Ac = Absorbance du contrôle. At = Absorbance du test.

Evaluation de l'activité Anti-inflammatoire :

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Williams et al, 2008**). De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode de la dénaturation des protéines (**Bouhlali et al, 2016**).

L'effet de la crème sur le test de dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) induite par la chaleur a été réalisé en utilisant une méthode décrite par (**Anyasor et al, 2019, Sakat et al., 2010**) avec des modifications mineures, la méthode consiste à préparer :

La solution d'essai (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de SBA 1 % et 0,05 ml de la crème avec des concentrations variables (250 µg/ml, 250 ng/ml et 250 pg/ml).

2. La solution contrôle (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 1 % et 0,05 ml d'eau distillé (control).

3. La solution contrôle produit (0,5 ml) composé de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml de la solution de la crème à une concentration de 250 pg/ml (control product).

4. La solution standard test (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 1 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodium (médicament de référence) avec des concentrations variables (250 µg/ml, 250 ng/ml et 250 pg/ml).

Toutes les solutions au-dessus ont été ajustées à pH 6,3 par une solution d'HCl (1N).

Les échantillons ont été incubés à 37° C pendant 20 min, ensuite la température était augmentée pour garder les échantillons à 57° pendant 20 min.

Après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution tampon phosphate (Ph=6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessus. L'absorbance est mesurée par le spectrophotomètre UV –visible à 660 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit:

$$\%d'inhibition = 1 - (\text{DO solution d'essai} - \text{DO control product} / \text{DO control}) \times 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées; et les résultats sont comparés avec le diclofénac sodium (médicament de référence).

Etude statistique : toutes les études statistiques ont été réalisées par le programme de statistique SAS version 0.9 (0.9 V)

Résultat et interprétation

Etude des activités biologiques in vitro de la crème à base d'huile d'olive, des graines de plantes médicinales et de la cire naturelle:

Pour l'étude des activités biologiques, nous avons fait appel à trois différents tests à savoir cytotoxicité, hémolyse et dénaturation des protéines

a. Test de cytotoxicité (figure 04, tableau A1.a et A1.b en annexes):

Le test de cytotoxicité in vitro est représenté par le pourcentage d'hémolyse des globules rouges, il est réalisé en utilisant des globules rouges (GR) d'un donneur en bonne santé.

Différentes concentrations de la crème à base d'huile d'olive, des graines de plantes médicinales et de la cire d'abeille naturelle sont testées par comparaison à l'acide gallique (polyphénol de référence).

Le pourcentage de l'hémolyse est évalué pour chaque concentration, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des globules rouges par hémolyse, en comparaison au contrôle négatif (C négatif (-)), solution de GR dans de l'eau physiologique, ayant un taux d'hémolyse très faible, 15%) et au contrôle positif (C positif (+)), solution de GR dans de l'eau distillée afin de provoquer une hémolyse totale, 100% d'hémolyse).

La comparaison des moyennes par le test de wilcoxon a montré que la différence est très hautement significative entre les différents produits (ddl =2 ; valeur de t = 17.0556; p = 0.0002) effectivement la procédure GLM a donné les mêmes résultats. Une différence très hautement significative a été trouvée entre les différents produits (ddl = 2 ; valeur de f = 302.05 ; p < 0.0001), entre les différentes concentrations (ddl = 3 ; valeur de f= 44.58 ; p < 0.0001) et entre les concentrations à l'intérieur des produits (ddl = 6; valeur de f= 112.03 ; p < 0.0001). Il n'y a pas de différence significative entre les répétitions (ddl = 2 ; valeur de f = 0.38 ; p = 0.6879) (tableau A1.b en annexes).

Nos résultats montrent que l'effet hémolytique de l'acide gallique à une valeur égale à 59% à la concentration de 0.3 mg/mL, un taux de 68.89% est obtenu à la concentration 0.4 mg/ml puis augmente à 90 % à la concentration 0.2 mg/mL

L'effet hémolytique de l'acide gallique atteint le maximum à la concentration de 0.15 mg/mL en comparaison avec le contrôle positif (C+ :100 %) (Figure 4).

La crème à base d'huile d'olive, des graines de plantes médicinales et de la cire naturelle montre un effet hémolytique des GR qui est de 70.89% à concentrations 0.4 mg/ml comparé au contrôle négatif (15%). Ce taux diminue avec la diminution de la concentration, à la concentration de 0.3 mg/ml et 0.2 mg/ml, le taux d'hémolyse est de 54.56 % et 37.11% respectivement. Aux concentrations de 0.15 mg/ml le taux d'hémolyse augmente et atteint 40.48%.

Les résultats montrent que la crème à base d'huile d'olive, des graines de plantes médicinales et de la cire naturelle d'abeille exerce un effet cytotoxique faible par rapport à l'acide gallique (molécule de référence) aux concentrations (0.3, 0.2 et 0.15 mg/ml), mais supérieur par rapport à l'effet hémolytique de l'acide gallique à la concentration 0.4 mg/ml.

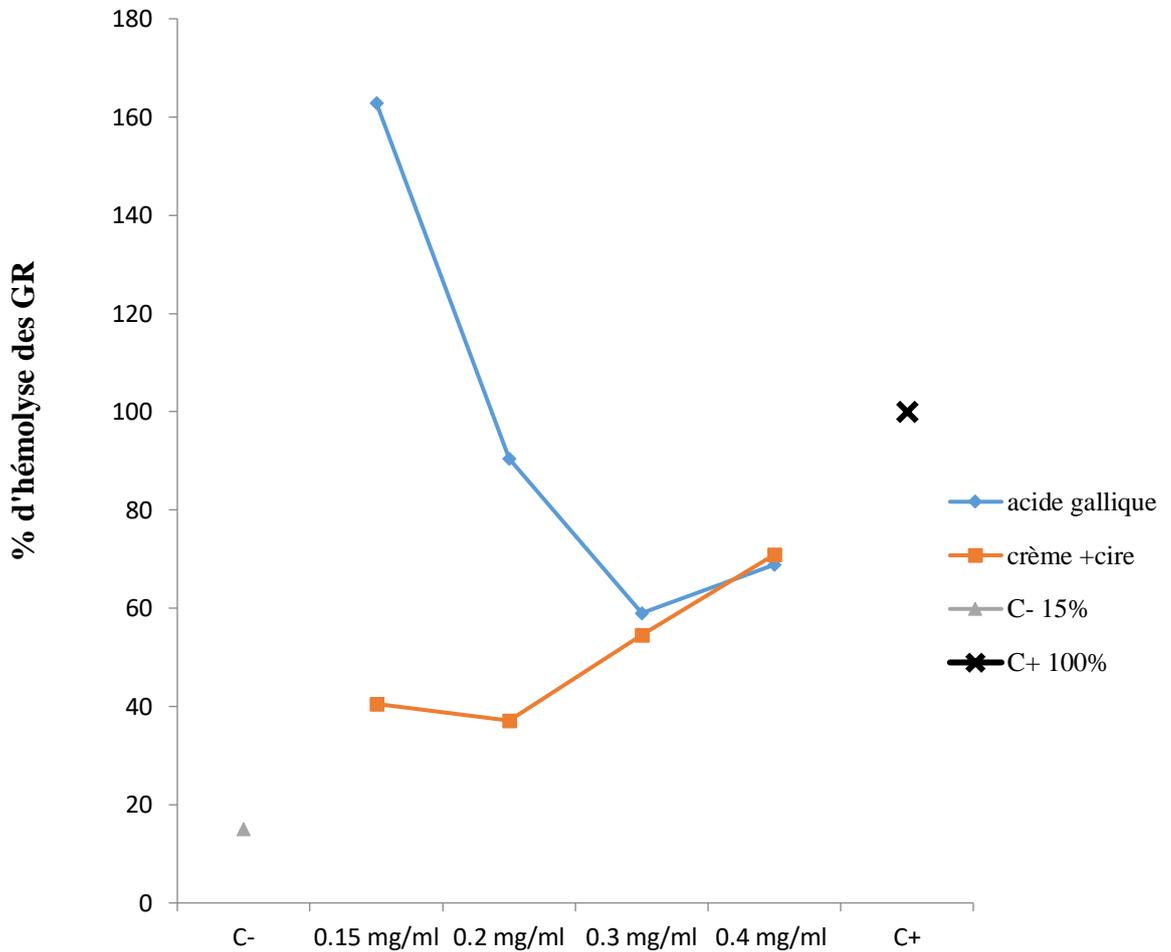


Figure 4 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique, la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle (Les résultats sont présentés sous forme de moyenne arithmétique)

1- b. Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges) (figure 5, tableau A2.a et A2.b en annexes):

L'étude de l'activité anti-hémolytique in vitro de la crème à base d'huile d'olive, des graines de plantes médicinales et de la cire naturelle d'abeille est réalisée en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges (GR). L'évaluation de la stabilisation membranaire est mesurée par le taux de libération de l'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration de la crème à base d'huile d'olive et de plante utilisée et en les comparants à deux molécules de référence, à savoir l'acide gallique et le Diclofénac qui est un médicament anti-inflammatoire et anti-hémolytique.).

La comparaison des moyennes par le test de wilcoxon a montré que la différence est très hautement significative entre les différents produits (ddl = 3 ; valeur de $t = 41.6303$; $p < 0.0001$) effectivement la procédure GLM a donné les mêmes résultats. Une différence très hautement significative a été trouvée entre les différents produits (ddl = 3 ; valeur de $f = 435.97$; $p < 0.0001$), entre les différentes concentrations (ddl = 4 ; valeur de $f = 41.06$; $p < 0.0001$) et entre les concentrations à l'intérieur des produits (ddl = 12 ; valeur de $f = 31.20$; $p < 0.0001$). Il n'y a pas de différence significative entre les répétitions (ddl = 2 ; valeur de $f = 1.09$; $p = 0.3450$) (tableau A2.b en annexes).

Nos résultats montrent que **l'acide gallique** présente un effet anti-hémolytique des GR faible, allant de 16.09% et 22.53% aux concentrations 0.4 mg/ml et 0.3 mg/ml respectivement, par la suite, l'effet protecteur augmente et représente 84.76 à 85.69 % pour les concentrations (0.1 et 0.2 mg/ml) respectivement. À la concentration de 0.15 mg/ml, un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes des GR, important de 90% de protection est constaté.

Le **Diclofénac** possède un effet anti-hémolytique élevé, à la concentration (0.2 mg/ml) on note un pourcentage de 90% montrant l'effet anti-hémolytique vis à vis des membranes des GR. à un effet anti-hémolytique important à la concentration 0.4 mg/ml, 0.3 mg/ml et 0.15 mg/ml avec un pourcentage de stabilité des membranes qui est en moyenne de (92% à 95% et 94%) respectivement. L'effet protecteur augmente à la concentration 0.1 mg/ml du Diclofénac et atteint 96.13% affichant un maximum de protection.

Le pouvoir protecteur de la crème à base d'huile d'olive, des graines de plantes médicinales et de la cire naturelle d'abeille est faible (29.47%, 23.93%) à concentration (0.4 et 0.3 mg/ml $\mu\text{g/mL}$), l'effet protecteur diminue à 19% à la concentration 0.2 mg/ml, par contre, à faible concentration, l'effet anti-hémolytique de la crème à base d'huile d'olive, de graines de plante

médicinales et de cire d'abeille augmente et atteint 51.16% et 56.76 % avec les concentrations 0.1 mg/ml et 0.15 mg/ml respectivement.

Les données obtenues avec la crème à base d'huile d'olive, de plante et de cire d'abeille indiquent qu'elle présente une activité faible comparée à celle de l'acide gallique et du Diclofénac. Cette activité stabilisatrice de la membrane des GR varie avec la concentration.

Les résultats obtenus montrent que la crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de cire d'abeille, aux concentrations (0.3 et 0.4mg/ml) présente un effet anti-hémolytique supérieur à celui de l'acide gallique.

Aux concentrations (0.2, 0.15 et 0.1mg/ml), l'effet protecteur de cette crème est plus faible que l'acide gallique.

L'effet du Diclofénac à différentes concentrations, reste supérieur à celui de l'acide gallique et de la crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de cire d'abeille aux mêmes concentrations.

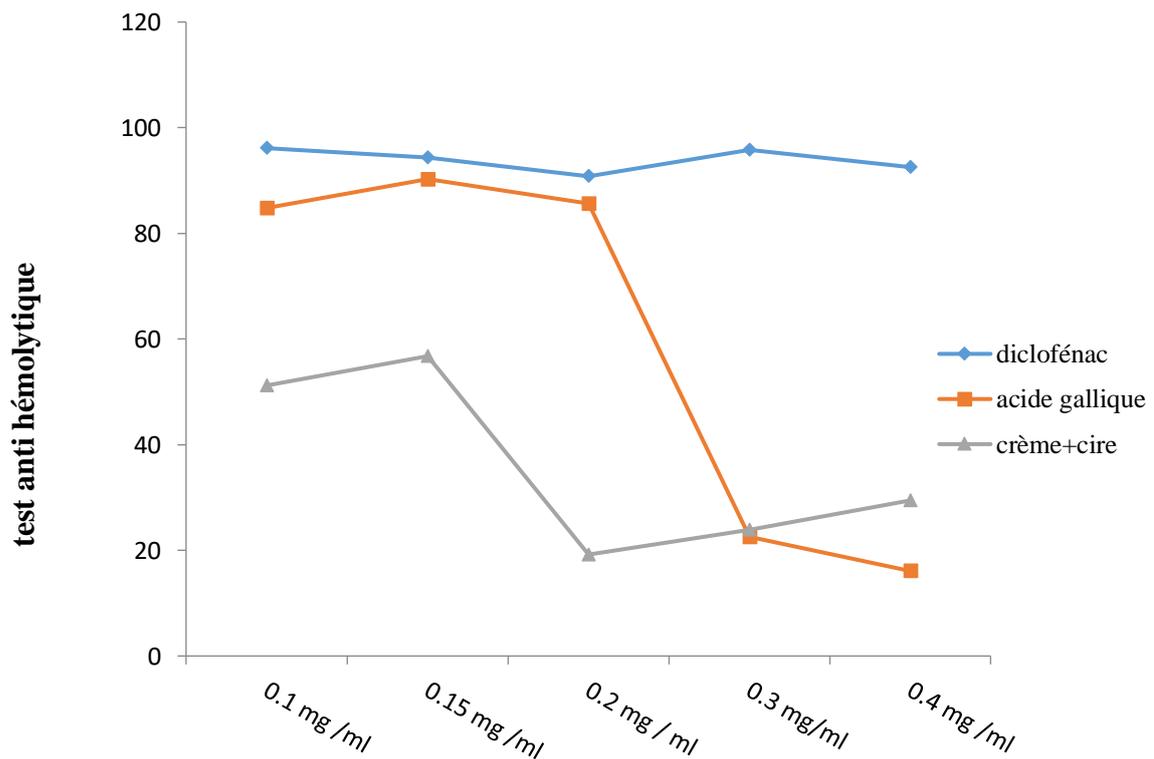


Figure 5 : l'effet anti-hémolytique (stabilité de la membrane des globules rouge) entre l'acide gallique, le Diclofénac et la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle (Les résultats sont présentés sous forme de moyenne arithmétique)

1- c. Test anti –Inflammatoire (figure 6, tableau A3.a et A3.b en annexes):

Le test d'inhibition de la dénaturation protéique est le plus convenable pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro de la crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire naturelle.

La protéine utilisée pour ces tests est l'albumine de sérum bovine (BSA).

La comparaison des moyennes par le test de wilcoxon a montré que la différence est significative entre les différents produits (ddl = 2 ; valeur de $t= 6.0452$; $p=0.0487$) effectivement la procédure GLM a donné les mêmes résultats. Une différence très hautement significative a été trouvée entre les différents produits (ddl = 2 ; valeur de $f = 205.73$; $p < 0.0001$), entre les différentes concentrations (ddl = 2 ; valeur de $f= 177.38$; $p < 0.0001$) et entre les concentrations à l'intérieur des produits (ddl = 4 ; valeur de $f= 176.14$; $p < 0.0001$).il n'y a pas de différence significative entre les répétitions (ddl = 1 ; valeur de $f = 4.36$; $p = 0.0702$) (tableau A3.b en annexes)

Les résultats montrent que le Diclofénac assure une bonne inhibition de la dénaturation protéique marquant ainsi son effet anti-inflammatoire par un pourcentage de 80.35% à la concentration de 250ng/ml, et aussi à faible concentration de 250 pg/ml, l'effet protecteur est de (79%) qui est identique à celui observé à la concentration de à la concentration 250µg/ml.

Les résultats obtenus avec la crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire naturelle indiquent un effet protecteur important contre la dénaturation de BSA. La crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire naturelle présente une activité inhibitrice de la dénaturation de BSA égale à 79.4% à la concentration de 250 µg/ml.

L'effet protecteur de la dénaturation de la BSA diminue au fur et à mesure avec la diminution de la concentration de la crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire naturelle et atteint 79 % à la concentration 250ng/ml.

À faibles concentrations (250 pg/mL), La crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de la cire naturelle présente un effet protecteur considérable (75.9%).

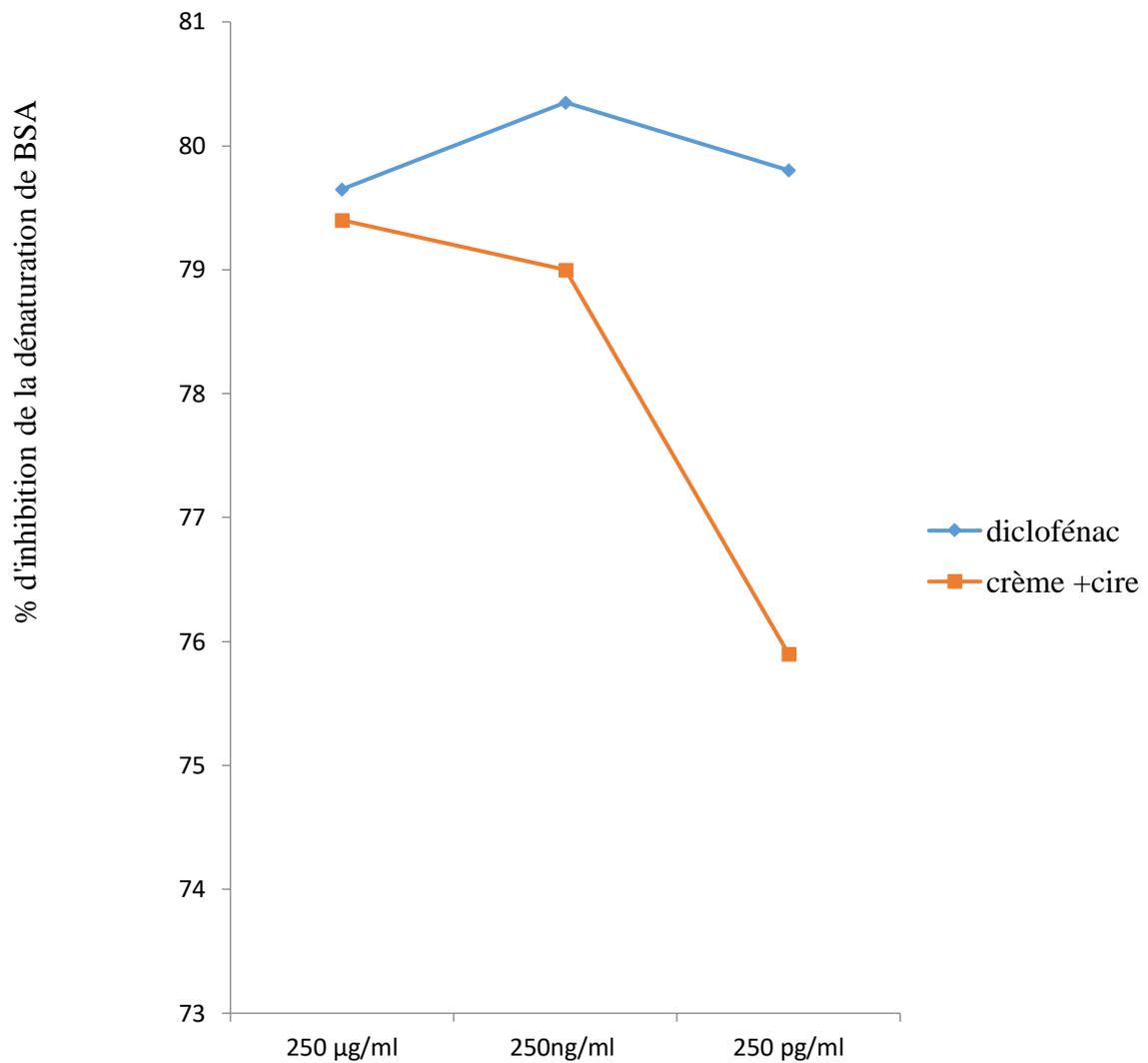


Figure 6 : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et la crème à base de d’huile d’olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle. (Les résultats sont présentés sous forme de moyenne arithmétique)

Discussion

La réponse d'un organisme à des lésions tissulaires initiées par un corps étranger telles qu'une infection microbienne, une lésion chimique ou une pollution environnementale qui entraîne une lésion cellulaire et la mort est l'inflammation (**Elgorashi et McGaw, 2019**).

Douleur, chaleur, rougeur et gonflement sont les manifestations classiques du processus inflammatoire. Les anomalies des articulations de la colonne vertébrale, des muscles associés, des tendons, des ligaments et des anomalies structurelles osseuses peuvent toutes entraîner des douleurs (**Maroon et al., 2010**). En règle générale, les patients n'auront pas besoin d'une intervention chirurgicale immédiate et auront donc besoin de traitements pour réduire la douleur et améliorer la qualité de vie des activités (**Maroon et al., 2010**).

L'utilisation de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est toujours le pilier de la plupart des cliniciens classiquement enseignés pour les douleurs inflammatoires, malgré leurs effets secondaires connus (**Maroon et al., 2010**).

Les mécanismes des AINS se font principalement par interaction avec les cytokines pro-inflammatoires interleukine (IL)-1a, IL1b, IL-6 et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) (**Maroon et al., 2010**). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) exercent leurs effets bénéfiques soit en inhibant la libération des enzymes lysosomales, soit en stabilisant les membranes lysosomales (**Anosike et al., 2012**).

En raison de leur efficacité à réduire la douleur et l'inflammation, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont parmi les médicaments les plus couramment utilisés, confirmant leur position dans la liste modèle des médicaments essentiels de l'OMS. Cependant, les AINS ont des effets indésirables dans les complications gastro-intestinales, cardiovasculaires, hépatiques, rénales, cérébrales et pulmonaires (**Bindu et al., 2020**).

Les plantes médicinales sont considérées comme un cadeau précieux offert par la nature gratuitement et elles ont été utilisées par les humains depuis l'Antiquité. Depuis les temps anciens, ils ont été utilisés par les peuples de diverses cultures comme une approche thérapeutique sûre. Selon l'OMS, environ 80% de la population mondiale, en particulier dans les pays en développement, dépendent principalement de la médecine traditionnelle à base de plantes pour leur santé sous forme de thé, de décoction ou d'extraits avec de l'eau, du lait (ou de l'alcool) et l'OMS a également recommandé d'utiliser les plantes comme médicaments là où la médecine conventionnelle n'est pas facilement disponible (**Iffath Hina et Caroline Rose, 2018**).

Les composés naturels ont longtemps été utilisés à des fins anti-inflammatoires. La contribution des études phytochimiques et ethnopharmacologiques a joué un rôle clé qui a conduit à l'identification, l'isolement, la caractérisation et la recherche du mécanisme d'action

d'une variété de composés actifs naturels. De plus, les manipulations potentielles des effets anti-inflammatoires utilisant les connaissances de la pharmacologie moléculaire ont amélioré nos connaissances sur les extraits naturels et rendu leurs utilisations cliniques plus saines **(Tasneem et al., 2019)**.

L'objectif de notre travail de master est l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire in vitro d'une crème à base d'huile d'olive, graines de plantes médicinales et de la cire naturelle.

La cire d'abeille est un produit complexe sécrété sous forme liquide par des glandes cireuses spéciales situées dans l'abdomen des jeunes abeilles ouvrières, elle peut être utilisée pour construire des nids d'abeilles, mélanger avec du pollen et la propolis, et même faire des bougies. La cire la plus couramment utilisée est produite par *Apis mellifera* et *Apis ceranae* **(Fratini et al., 2016)**.

Elle se compose en hydrocarbures, mono esters, diester, triesters, hydroxy mono esters, hydroxy polyesters, acides libres, mono esters acides, polyesters acides et autres. Les compositions des acides, hydroxy acides, alcools et diols de chaque fraction d'ester ont été déterminées par chromatographie gaz-liquide **(Tulloch, 1971)**.

Les diols étaient le 1,23-tétracosanediol, le 1,25-hexacosanediol, le 1,27-octacosanediol et le 1,29-triacontanediol. Des quantités mineures de diols a C24-C28 ont également été détectées. **(Tulloch, 1971)**.

L'évaluation de la cytotoxicité de la crème à base d'huile d'olive, des graines de plantes médicinales et la cire naturelle est réalisée in vitro par l'utilisation des globules rouges. La crème de notre étude aux concentrations (0.3, 0.2 et 0.15 mg/ml), mais supérieur par rapport à l'effet hémolytique de l'acide gallique à la concentration 0.4 mg/ml. La crème ne présentait pas un effet nocif sur les érythrocytes à de faibles concentrations par rapport à l'acide gallique qui est utilisé dans notre travail comme un polyphénol de référence.

Concernant nos résultats obtenus avec cette crème indiquent que l'effet cytotoxique est concentration dépendant. Par rapport à l'acide gallique qui est utilisé dans notre travail comme un polyphénol de référence, la crème ne présentait pas un effet nocif sur les érythrocytes à de faibles concentrations.

La plupart des plantes ont des propriétés médicinales, il est important que leurs risques de toxicité soient évalués. Les érythrocytes sont largement utilisés car il présente une indication directe de la toxicité des formulations injectables ainsi qu'une indication générale de la toxicité membranaire, la membrane des érythrocytes peut être affectée par la consommation de composés bioactifs provenant d'herbes et de plantes médicinales **(Mohammedi et Atik, 2014)**.

Les résultats obtenus par **Mohammedi et Atik (2014)**, indiquent que la majorité des extraits de différentes plantes de leur étude manifestent une faible activité hémolytique mais une grande attention prendra avec les plus grandes concentrations.

La stabilisation de la membrane lysosomale est importante pour prévenir les processus inflammatoires (**Al-Timimi et Hameed, 2016**). Le choix de la lyse des érythrocytes induite par hypotonie pour prouver l'effet stabilisateur de la membrane parce que la membrane des globules rouges humains est considérée comme similaire à la membrane **lysosomale** (**Al-Timimi et Hameed, 2016**).

Les résultats obtenus montrent que la crème à base d'huile d'olive de graines de plantes médicinales et de cire naturelle, aux concentrations (0.3 et 0.4 mg/mL) présente un effet anti-hémolytique supérieur à celui de l'acide gallique. Aux concentrations (0.2, 0.15 et 0.1 mg/mL), l'effet protecteur des de la crème d'huile d'olive de graines de plantes médicinales et de cire naturelle est inférieur à celui de l'acide gallique.

L'exposition des globules rouges (GR) à des substances nocives telles que le milieu hypotonique, la chaleur, le salicylate de méthyle ou la phénylhydrazine entraîne la lyse des membranes, accompagnée d'une hémolyse et d'une oxydation de l'hémoglobine (**Anosike et al., 2012**).

L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule entraînant la rupture de sa membrane. Une lésion de la membrane érythrocytaire rendra la cellule plus sensible aux dommages secondaires par peroxydation lipidique induite par les radicaux libres (**Anosike et al., 2012**).

La stabilisation de la membrane globules rouges humains a été utilisée car la membrane des érythrocytes est analogue à la membrane des lysosomes (**Kiranmayi, et al., 2018**), l'inhibition de l'hypotonie et de la lyse de la membrane des globules rouges induite par la chaleur a été considérée comme une mesure du mécanisme de l'activité anti-inflammatoire (**Anosike et al., 2012**).

La stabilisation membranaire conduit à la prévention des fuites de protéines sériques et de fluides dans les tissus pendant une période de perméabilité accrue causée par des médiateurs inflammatoires (**Anosike et al., 2012**).

La stabilisation des lysosomes est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant les neutrophiles actifs de libérer des composants des lysosomes tels que des des protéases lors d'une infection microbienne (**Kiranmayi, et al., 2018 ; SreeKumari et al., 2015**).

La crème de notre étude est un mélange complexe contenant de multiples composés (l'huile d'olive, graines de plantes médicinales et la cire naturelle d'abeille), qui peuvent interagir et exercer un effet protecteur des membranes des globules rouges, mais à un faible degré par comparaison au diclofénac, comme le montre les résultats obtenus, cette crème peut être un agent anti hémolytique potentiel.

Les protéinases ont été impliquées dans les réactions arthritiques. Les neutrophiles sont une riche source de protéinases à sérine, qui sont localisées dans les granules des lysosomes. Les protéinases leucocytaires sont impliquées dans le développement de lésions tissulaires lors de réactions inflammatoires et les inhibiteurs de protéinases offrent une protection substantielle contre cet effet. Il a été rapporté que des extraits au méthanol d'*O. corniculata* avaient une activité antiprotéinase significative (Naz et al., 2017). Dans l'étude de Naz et al. (2017), des valeurs élevées de coefficients de corrélation ont été trouvées entre le contenu phénolique total et l'activité d'inhibition anti-inflammatoire et anti-protéinase des extraits de plantes sélectionnés.

Il a été rapporté que les flavonoïdes exercent des effets stabilisants profonds sur les lysosomes à la fois in vitro et in vivo chez les animaux de laboratoire tandis que le tanin et les saponines ont la capacité de se lier aux cations et autres biomolécules et sont capables de stabiliser la membrane érythrocytaire (James et Nnacheta, 2008).

L'activité élevée de stabilisation de la membrane de l'extrait de tige de *C. multistriata* observée dans l'étude réalisée par James et Nnacheta, (2008) peut être due à sa teneur élevée en flavonoïdes et en tanin. Des préparations à base de plantes sont capables de **stabiliser la membrane des globules rouges et d'exercer une activité anti-inflammatoire (James et Nnacheta, 2008)**.

L'inhibition de l'hémolyse des globules rouges dans les milieux hypotoniques offre un mécanisme supplémentaire d'effet anti-arthritique. L'extrait de plante et les fractions ont présenté une stabilisation dose-dépendante acceptable de la membrane des globules rouges. L'attribut de stabilisation membranaire de *B. orthobotrys* pourrait être associé à son action interférente sur la libération du contenu lysosomal des neutrophiles (Alamgeer et al., 2017).

Le test d'inhibition de la dénaturation protéique est le plus convenable pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro. Le test Bovine Serum Albumin (BSA) cherche à éliminer autant que possible l'utilisation d'échantillons vivants dans le processus de développement du médicament (Williams et al., 2008).

La dénaturation des protéines peut être due à la production d'auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques. L'altération des liaisons électrostatiques hydrogène, hydrophobe et disulfure se produit dans le mécanisme de dénaturation (**Kiranmayi, et al., 2018**).

Dans notre étude, les résultats indiquent clairement que cette crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de cire naturelle a un potentiel anti-inflammatoire, étant des mélanges complexes contenant de multiples composés, qui peuvent interagir avec BSA et inhiber sa dénaturation.

Dans notre étude, les résultats indiquent clairement que cette crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de cire naturelle a un potentiel anti-inflammatoire. Cette crème présente une activité inhibitrice de la dénaturation de BSA égale à 79.4% à la concentration de 250 µg/ml. Les différents constituants de la crème qui font d'elle un mélange complexe, peuvent interagir avec BSA et inhiber sa dénaturation.

Sur la base des missions de résonance magnétique nucléaire du proton à une et deux dimensions (1D et 2D 1H RMN) pour BSA, quelques prédictions sont faites sur les sites d'interaction/liaison possibles de molécules avec anti-action de dénaturation sur l'albumine de sérum bovin (**Williams et al., 2008**). Deux des sites de liaison intéressants se trouvent dans les régions de résidus de thréonine et de lysine aromatiques riches en tyrosine et aliphatiques de la BSA (**Williams et al., 2008**). À partir de ces interactions sur la BSA, certaines des molécules thérapeutiques intéressantes pourraient activer le récepteur riche en motifs de tyrosine en double avec la thréonine qui régule les voies biologiques de transduction du signal pour leur action biologique globale (**Williams et al., 2008**).

Ces composés interagissant avec les régions aliphatiques autour du résidu lysine sur la BSA pourraient être intéressants en tant qu'antioxydants à activité anticancéreuse tels que les polyphénols, les phénylpropanoïdes et les disulfures (par exemple l'acide alpha-lipoïque) et pourraient également jouer des rôles importants comme anti-composés de glycation (**Williams et al., 2008**).

La cristallisation de molécules, par exemple le trisulfure de dibenzyle et l'eugénol, a également été réalisée pour des analyses cristallographiques aux rayons X qui, espèrent les auteurs, valideront davantage les sites de liaison des composés dans la BSA (**Williams et al., 2008**).

D'après le résultat de l'étude de **Kiranmayi, et al. (2018)**, les extraits de feuilles de *B. purpurea* sont capables d'en inhiber la dénaturation et son effet a été comparé au médicament standard diclofénac sodique. Cet effet peut être dû à la présence de stéroïdes, d'alcaloïdes et de flavonoïdes présents dans diverses fractions. les résultats révèlent que l'extrait éthanolique

de feuilles de *B. purpurea* est capable de contrôler la production d'auto-antigènes et inhibe également la dénaturation des protéines, la dénaturation de l'albumine et la lyse membranaire dans les maladies rhumatismales (**Kiranmayi, et al., 2018**).

L'huile d'olive est principalement composée de triacylglycérols (98 à 99 %), dans lesquels prédominent les acides gras monoinsaturés (AGMI ; 70 à 80 % d'acide oléique), la fraction insaponifiable contient plus de 200 composants mineurs, notamment des α - et γ -tocophérols, des tocotriénols, du β -carotène, des phytostérols, des flavonoïdes et des composés phénoliques hydrophiles (Fernandes et al., 2020). Parmi les nombreux constituants de l'huile d'olive, une attention particulière a été accordée aux composés phénoliques, en grande partie en raison de leur effet antioxydant mais aussi à son activité anti-inflammatoire (**Fernandes et al., 2020**).

Le but de l'étude réalisée par **Maalej et al. (2017)** était d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait éthanolique d'olive (OFE) et de son composé phénolique, l'oleuropéine (OLE), contre la toxicité hépato-rénale induite par la deltaméthrine (DEM), un pyréthroïde synthétique, chez des rats Wistar. L'effet toxique a été confirmé par des études histologiques et les niveaux d'expression des gènes inflammatoires (cox-2) et apoptotiques (bcl-2 et p53). Les résultats ont mis en évidence l'efficacité des composés phénoliques de l'olive en tant que protecteur hépatique et rénal dans la toxicité hépato-rénale induite par le DEM en améliorant l'état oxydatif ainsi qu'en supprimant l'inflammation et l'apoptose, par conséquent, ils peuvent être utilisés comme composés naturels protecteurs contre la toxicité hépato-rénale induite par le DEM (**Maalej et al., 2017**).

Conclusion

Un anti-inflammatoire est médicament destiné à traiter une réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent telles que les manifestations rhumatismales, mais il provoque des effets secondaires.

Les plantes ont un potentiel en tant qu'agents thérapeutiques de l'inflammation.

Notre étude a examiné l'activité anti-inflammatoire d'une crème à base d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de cire naturelle d'abeille, à l'aide de trois tests in vitro : cytotoxicité, inhibition de l'hémolyse et inhibition de la dénaturation des protéines

Un effet cytotoxique faible de 70.89% à une concentration forte de 0.4 mg/ml du crème, l'inhibition de la dénaturation des protéines et de l'action des protéases qui atteint 79.4% à une concentration forte de 250 µg/ml, ce qui la rencontre d'autre part une faible stabilisation des membranes des globules rouges atteint une valeur de 51.16% à 56.76 concernant des concentrations faibles de 0.1 mg/ml et 0.15 mg/ml de ce produit.

Les résultats ont révélé que la crème étudiée possède des propriétés anti-inflammatoires à différents niveaux, ce qui pourrait être dû aux différences de composition et de concentration des composés bioactifs.

Ces études doivent être focalisées sur la recherche des composés bioactifs dans les extraits de plantes utilisée ou sur la cire et l'évaluation de l'effet de ces composés sur les cellules inflammatoires et leurs voies de signalisations, les enzymes impliquées dans la production des espèces oxygénées réactives.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce mémoire, consiste une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement active, il serait intéressant d'étayer ce travail en :

Cependant, d'autres études sont nécessaires, telles que l'isolement de composés bioactifs, la confirmation des activités in vitro dans des modèles animaux et la gravité des effets secondaires ou leur absence doivent être étudiées plus avant, évaluation de l'activité anti oxydante.

Les molécules ou extraits démontrant une activité anti-dénaturante aux doses les plus faibles possibles sont à sélectionner pour des criblages à large spectre en vue du développement d'une large gamme de médicaments thérapeutiques.

Références Bibliographique

- Achab D (2020). Cours de biochimie clinique, université Mouloud Mammeri TIZI OUZOU, faculté de médecine. Pp01
- Alamgeer U, Ambreen Malik Uttra and Umme Habiba Hassan (2017). Anti-arthritis activity of aqueous-methanolic extract and various fractions of *Berberis arthrobotrys* Bien ex Aitch. BMC complementary and Alternative Medicine. 17:371
- Al-Timimi S S et S Hameed (2016). Evaluation of Anti Oxidant and Anti inflammatory Activity of Banana Peels. *Advances in Life Science and Technology*. 46: 10-15.
- Ambriz-Pérez D L, Leyva-López N., Gutierrez-Grijalva E P et Heredia J. B (2016). Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2: 1131412.
- Anh, Kim, Long, Min, Yoon, Lee et Kwon. (2020). Ginger on Human Health: A Comprehensive Systematic Review of 109 Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 12(1), 157.
- Anosike C A, Obidoa O et Ezeanyika, L U (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 76.
- Anyasor G N, Okanlawon A et Ogunbiyi B (2019). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. *Clinical Phytoscience* 5:49 ,P13
- Augusto O, Kunze KL and Montellano PR (1982). N phenyl protoporphyrin formation in the haemoglobin phenylhydrazine reaction. *Journal of Biological Chemistry* 257 Pp 6231-6241.
- Bailey-Shaw Y A, Lawrence A D, Williams , Cheryl E G , Shawntae Rodney, Ann M S 2017. In-Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Potential of Selected Jamaican Plant Extracts using the Bovine Serum Albumin Protein Denaturation Assay. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 47 Article No. 27, Pp 145-153
- Bindu S , Mazumder S, et Bandyopadhyay U (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. *Biochemical Pharmacology*, 114:147.
- Blain H, Vuillemin A, Blain A et Jeandel C (2000). Les effets préventifs de l'activité physique chez les personnes âgées. *Presse Med.*;29 Pp 1240-1248.
- Botting, R. M., et Botting, J. H (2000). Pathogenesis and Mechanisms of Inflammation and Pain. *Clinical Drug Investigation*, 19(Supplément 2), 1–7
- Bouhlali E. dine T, El Hilaly J , Ennassir, J , Benlyas M , Alem C, Amarouch, M.-Y, et Filali-Zegzouti Y (2017). Anti-inflammatory properties and phenolic profile of six

- Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. *Journal of King Saud University - Science*.
- Bouhlali EDT, Sellam K, Bammou M, Alem C et Filali-zehzouti Y (2016). In vitro Antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6 : Pp 156-162.
 - Bulmus V, Woodward M, Lin L, Murthy N, Stayton P, Hoffman A (2003). A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of Controlled Release*. 93 :Pp 105-120.
 - Carroll G L et Simonson S M (2005).Recent developments in non steroidal antiinflammatory drugs in Association.; 41 Pp 347-354.
 - Chopade AR, Sontakke PM et Sayyad FJ (2012) .Membrane stabilizing activity and protein denaturation: A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Phyllanthus amarus*. *Journal of Karad Institute of Medical Sciences University* 1 Pp 67-72.
 - Claude HEYMONET (2013). Les plantes à visée anti-inflammatoire utilisées en phytothérapie, Thèse. Université de Lorraine Faculté de pharmacie. Pp 156.
 - Di Nunzio M, G Picone, F Pasini, M Fiorenza Caboni, A Gianotti, A Bordoni, F Capozzi (2018). Olive oil industry by-products. Effects of a polyphenol-RICH extract on the metabolome and response to inflammation in cultured intestinal cell. *Food Research International*. 113 Pp 392-400.
 - Dubois R N , Abramson S B, Crofford L, Gupta R. A , Simon L S , A Van De Putte L B , et Lipsky P E (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal*.; 12 Pp 1063-1073.
 - Dulce L , Ambriz-Pérez , Nayely Leyva-López , Erick P, Gutierrez-Grijalva et J Basilio Heredia (2016) ;Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. areview.*Cogent Food & Agriculture*;2 1131412
 - Elgorashi E E et Mc Gaw L J (2019). African plants with in vitro anti-inflammatory activities: A review. *South African Journal of Botany* 126 Pp 142–169.
 - Elisha, I. L., Dzoyem, J.-P., McGaw, L. J., Botha, F. S., & Eloff, J. N. (2016). The anti-arthritis, anti-inflammatory, antioxidant activity and relationships with total phenolics and total flavonoids of nine South African plants used traditionally to treat arthritis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16 Pp 307.
 - Enseignants d'Immunologie des Universités (2011). Item 127 Traitement d'immunosuppresseurs, Université Médicale Virtuelle Francophone. Pp 03.

- Fernandes J, Fialho M, Santos R, Peixoto-Placido C, Madeira T, Sousa-Santos N, Virgolino A, Santos O et Vaz Carneiro A (2020). Is olive oil good for you? A systematic review and meta-analysis on anti-inflammatory benefits from regular dietary intake. *Nutrition* 69: Pp 110-559.
- Ferrero-Miliani L, Nielsen O H , Andersen P S et Girardin S E (2006). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clinical and Experimental Immunology*, 147: Pp 227-235.
- Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A (2016). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9 Pp 839–843.
- Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*;3 Pp 162-169.
- Godswill Nduka Anyasor , Azeezat Adenike Okanlawon et Babafemi Ogunbiyi (2019) .Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. *Clinical Phytoscience* Pp 1-13
- Guedj Nathalie, Pierre Bedossa (2015) , *INFLAMMATION CHRONIQUE / FIBROSE*, Paris diderot. Pp01
- Guedj N, Bedossa P (2015). *Inflammation Chronique / Fibrose*, Paris Diderot. P01
- Guemra et Mecherour K (2018). Huile d'olive : Qualité, Activité Anti-oxydante et Anti-inflammatoire in vitro et in vivo. Mémoire de fin d'étude. microbiologie, Université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel. Pp 21.
- Hollman P.C.H., M.B. Batan (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man, *Biomed. Pharmacotherapy* 51 Pp 305–310
- Iffath Hina M et Caroline Rose J (2018). In Vitro Anti-Inflammatory and Antiarthritic Activity of *Pergularia daemia* Leaves and Roots. *Int J Drug Dev & Res.* 10 Pp 10-13.
- Iwalewa EO, Mcgaw L, Naidoo V et Eloff J N (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 Pp 2868–2885.
- James O et Nnacheta O P (2008). Comparative antioxidant capacity, membrane stabilization, polyphenol composition and cytotoxicity of the leaf and stem of *Cissus multistriata*. *African Journal of Biotechnology.* 7 Pp 3129-3133.
- Joseph C. Maroon Jeffrey W. Bost et Adara Maroon (2010) .Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *SURGICAL NEUROLOGY INTERNATIONAL*;1 Pp 80.

- Kaplan M, Mutlu Ece A , Benson M , Fields J, Banan A, Keshavarzian A (2007). Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. *Complementary Therapies in Medicine* 15 Pp 207-216
- Kidd B L et Urban L A (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, 87 Pp 3-11.
- Kiran Mayi G , V Anusha, Y Chandrika, I V Satya Priya, K U B G Santhu Swetha , Y Vamsi Krishna (2018). Preliminary phytochemical screening and in vitro evaluation of anti-inflammatory, antiarthritic, and thrombolytic activities of ethanolic leaf extract of *Bauhinia purpurea*. *International Journal of Green Pharmacy*. 12 Pp 241-247.
- Kiranmayi G V N , Anusha V , Chandrika Y, Satya Priya I V , Santhu Swetha K U B G , Vamsi Krishna Y (2018). Preliminary phytochemical screening and in vitro evaluation of anti-inflammatory, antiarthritic, and thrombolytic activities of ethanolic leaf extract of *Bauhinia purpurea*. *International Journal of Green Pharmacy*, 12 Pp 241.
- Kouakou S , Kouakou G , Laba I D , et Brou J (2010). Évaluation de l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus caberu*(Rubiaceés), une plante médicinale de Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences.*; 4 Pp 1-6.
- L A D Williams , A O'Connar, L Latore, O Dennis, S Ringer, J A Whittaker, J Conrad, B Vogler, H Rosner W Kraus (2008) . Natural Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Albumin is Proposed as a Screening Assay for the Det Anti-inflammatory Compounds, without the use of Anim Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Med*; 57 Pp 327.
- Le personnel de sickkids hospital, 2013, Inflammation and the immune system [en ligne].
- Maalej A, Mahmoudi A, Bouallagui Z, Fki I, Marrakchi R, Sayadi S (2017). Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. 106 Pp 455-465.
- Mahat M A et Patil B M (2007).Evaluation of anti-inflammatory activity of methanol extracts of *Phyllanthus amarus* in experimental animal models. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* 9 Pp33-36.
- Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A , Pougna J L , et Perrin C (2016). Hemolysis by surfactants — A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 228 Pp 1–16
- Marliyah M, T Ananthi (2015). In-vitro anti-inflammatory activity of seed extract of *Zea mays* (L.).*J Global Bio SCI*. Vol 4 , Pp. 73-2168.
- Maroon J C, Bost J W et Maroon A (2010). Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surg Neurol Int*; 1 Pp 80.

- Mayol K (2021). les médiateurs de l'inflammation [en ligne]. Disponible sur : <http://accs.ens-lyon.fr/accs/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/immunité-innée-barrières-naturelles-et-réaction-inflammatoire/les-médiateurs-de-l2019inflammation>[date de consultation: 16/Février /2021].
- Mélina Zerbato (2010). Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine C Réactive au cabinet de pédiatrie. These. Université Henri Poincaré - Nancy 1. Faculté de Pharmacie. Pp07.
 - Mizushima Y et Kobayashi M (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with the same biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20 Pp 169-173.
 - Mohammedi Z et Alik F (2014). Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. 5 Pp 495-500.
 - MUCRONATA LEAVES. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* Vol. 6 No.3. Pp 482-485.
 - Muster D (2005). Médicaments de l'inflammation. EMC - Stomatologie, 1 Pp 21-29.
 - Naz R, Hafsa Ayub , Sajid Nawaz , Zia Ul Islam , Tayyaba Yasmin , Asghari Bano , Abdul Wakeel , Saqib Zia and Thomas H. Roberts (2017). Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17 Pp 302-315.
 - Omale J and Okafor PN (2008). Comparative antioxidant capacity and cytotoxicity of the leaf and stem of *Cissus multistriata*. *African Journal of Biotechnology* , 7 Pp 3129-3133.
 - Oyedapo OO, Akinpelu BA, Akinwunmi KF, Adeyinka MO, Sipeolu FO (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantanacamara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2 Pp 46-51.
 - Preynat S O, A Deom, Dagmar Kessler. CSCQ (2010). Fiche TECHNIQUE: 31 Échantillon hémolysé, lipémique, ictérique. Quality control centre Switzerland. Pp01.
 - Pungle R, Tambe A, More A et Kharat A. (2018). Anti-inflammatory and antioxidant potentiality of *Solanum xanthocarpum*. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 17 Pp. 1188-1195
 - Rahmani S , Asgary S , G Askari M , Keshvari M. Haitami Pour M , A Feizi et A Shabkar (2016). Traitement de la curcumine dans les stéatoses hépatiques non

alcooliques: Un essai contrôlé par placebo et randomisée. *Phytotherapy Research.*; 30
Pp 1540-1548

- Rousselet MC, J.M. Vignaud, P. Hofman et F.P. Châtelet (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3), Pp 01
- S Cicerale, L Lucas et R Keast (2012). Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *Int. J. Mol. Sci*, 11 Pp 458-479.
- Sadique J, Al-Rqobah W A, Bughaith MF, El-Gindy AR (1989).The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*. 60 Pp 525-532.
- Sakat SS, Juvekar A R et Gambhire M N (2010). Invitro antioxidant and antiinflammatory activity of methanol extract of oxalis corniculata linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1 Pp 146- 155.
- schwartz k (2012). inflammation et maladies : clé de compréhension 2011-2012. Inserm association. Pp 57-60.
- Schwartz K (2011-2012). Inflammation et maladie, clé de compréhension. Pp07.
- Sivaraj, C., Nikhishaa-Sree, R. P., Arumugam, P & Gayathri,K. (2017). Antiinflammatory, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Essential Oil Extracted from *Salvia officinalis L*. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol.5, N°6, pp.257-263
- Slim K , Joris J et Beloeil H (2016). Colonic anastomoses and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Visceral Surgery*, 153 Pp 269-275.
- Slim, K., Joris, J., et Beloeil, H (2016). Colonic anastomoses and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Visceral Surgery*, 153(4), 269–275.
- Sowemimo-Coker, S. O. (2002). Red blood cell hemolysis during processing. *Transfusion Medicine Reviews*, 16 Pp 46–60
- Sree Kumari C, Yasmin N, Raffiq M H et Selvam M. B (2015). In vitro anti-inflammatory and anti-arthritic property of rhizophora .Pp 482-485
- Tasneem S, Liu B, Li B, Choudhary Mi, Wang W (2019). *Molecular Pharmacology Of Inflammation: Medicinal Plants As Anti-Inflammatoryagents*, *Pharmacological Research*. Volume 139 . Pp 126-140.
- Thenmozhi V, Elango V, Sadique J (1989). Anti-Inflammatory Activity of Some Indian Medicinal Plants. *Ancient Science Of Life* .Pp 3-4.
- Tulloch A P. (1971). Beeswax: Structure of the esters and their component hydroxy acids and diols. *Chemistry and Physics of Lipids*, 6 Pp 235–265.

- Uthman ED (2007). « Acute Appendicitis », dans Nom de la banque (2007), sur le site flickr.com. Consulté le 09 février 2007.
- Valliere L, Rivest S (2000). L'interleukine-6 dans le système nerveux central, M /S Synthèse. Pp 937.
- Vane J. R. et Botting R. M (1998). Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Research*. 47, Supplement 2. Pp 78-87.
- Williams LAD, Connar A O, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, Conrad J, Vogler B, Rosner H, Kraus W (2008). The in vitro Anti-denaturation Effects Induced by Natural Products and Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed as a Screening Assay for the Detection of Anti-inflammatory Compounds, without the use of Animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Med J*. 57 Pp 327- 331.

Annexes

Tableau A1.a : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique, la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et de cire naturelle.

	C-	0.15 mg/ml	0.2 mg/ml	0.3 mg/ml	0.4 mg/ml
acide gallique		162,89	90,48	59	68,89
crème +cire		40,48	37,11	54,56	70,89

Tableau A1.b : analyse descriptive de test de cytotoxicité.

Niveau de produit	Niveau de concentration	Nb	-----antihemo----- Moyenne	Écart-type
Crème naturelle et cire	0.15	3	40.480000	0.3915354
Crème naturelle et cire	0.2	3	37.110000	2.2200000
Crème naturelle et cire	0.3	3	54.556667	8.6650005
Crème naturelle et cire	0.4	3	70.890000	4.6700000
acide galique	0.15	3	162.890000	11.1100000
acide galique	0.2	3	90.483333	1.9142971
acide galique	0.3	3	59.000000	3.5600000
acide galique	0.4	3	68.890000	7.0000000

Tableau A2.a : l'effet anti-hémolytique (stabilité de la membrane des globules rouge) entre l'acide gallique, le Diclofénac et la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle.

	0.1 mg / ml	0.15 mg / ml	0.2 mg / ml	0.3 mg/ml	0.4 mg / ml
diclofénac	96,13	94,36	90,8	95,82	92,49
acide gallique	84,76	90,27	85,69	22,53	16,09
crème+cire	51,16	56,76	19,2	23,93	29,47

Tableau A2.b : analyse descriptive de test anti-hémolytique

Niveau de produit	Niveau de concentration	Nb	-----ANTHEMOLYSE----- Moyenne	Écart-type
Acide galique	0.1	3	84.7566667	1.9353639
Acide galique	0.15	3	90.2700000	0.4000000
Acide galique	0.2	3	85.6866667	0.3370954
Acide galique	0.3	3	22.5300000	1.2000000
Acide galique	0.4	3	16.0900000	2.6002308
Crème naturelle et cire	0.1	3	51.1566667	5.9351186
Crème naturelle et cire	0.15	3	56.7566667	5.9351186
Crème naturelle et cire	0.2	3	19.2000000	0.6700000
Crème naturelle et cire	0.3	3	32.9300000	4.8000000
Crème naturelle et cire	0.4	3	29.4666667	5.8650007
déclofénac sodique 100 mg	0.1	3	96.1333333	1.7350024
déclofénac sodique 100 mg	0.15	3	94.3566667	0.7359574
déclofénac sodique 100 mg	0.2	3	90.8000000	0.9300000
déclofénac sodique 100 mg	0.3	3	95.8233333	0.7311179
déclofénac sodique 100 mg	0.4	3	92.4866667	0.7359574

Tableau A3.a : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et la crème à base de d'huile d'olive, de graines de plantes médicinales et la cire naturelle

test d'inhibition de la dénaturation de BSA	250 µg/ml	250ng/ml	250 pg/ml
diclofénac	79,65	80,35	79,8
crème +cire	79,4	79	75,9

Tableau A3.b : analyse descriptive de test anti-inflammatoire

Niveau de produit	Niveau de concentration	Nb	-----BSA----- Moyenne	Écart-type
Crème naturelle et cire	1	2	0.01600000	0.00000000
Crème naturelle et cire	2	2	0.02000000	0.00000000
Crème naturelle et cire	3	2	0.05100000	0.00000000
déclofénac sodique 100 mg	1	2	0.01350000	0.00353553
déclofénac sodique 100 mg	2	2	0.00650000	0.00070711
déclofénac sodique 100 mg	3	2	0.01200000	0.00424264

Résumé

L'inflammation ou réaction inflammatoire est un mécanisme naturel qui va se mettre en place quand l'organisme subit une agression : chimique, toxique, microbienne, traumatique. Les anti-inflammatoires (les médicaments chimiquement synthétisés) ont des effets secondaires. L'objectif de notre étude est concentrée sur l'utilisation des plantes médicinales comme agents anti-inflammatoires nous avons utilisés une crème à base de la cire et l'huile d'olive et graines de quelques plantes médicinales à différentes concentration pour étudier les activités anti-inflammatoires in vitro en termes d'effet de l'hémolyse induite par une solution hypotonique sur la stabilisation de la membrane des globules rouges, l'effet d'inhibition de l'activité de dénaturation des protéines et l'effet de réduire la Cytotoxicité. L'évaluation de la Cytotoxicité de la crème à base d'huile d'olive, des graines de plantes médicinales et la cire naturelle est réalisée in vitro par l'utilisation des globules rouges. La crème de notre étude aux concentrations (0.3, 0.2 et 0.15 mg/ml), mais supérieur par rapport à l'effet hémolytique de l'acide gallique à la concentration 0.4 mg/ml. La crème ne présentait pas un effet nocif sur les érythrocytes à de faibles concentrations par rapport à l'acide gallique qui est utilisé dans notre travail comme un poly phénol de référence.

Mots clés : inflammation, anti-inflammatoires, l'huile d'olive, plantes médicinales

Abstract

Inflammation or inflammatory reaction is a natural mechanism that will take place when the body is attacked: chemical, toxic, microbial, traumatic. Anti-inflammatory drugs (chemically synthesized drugs) have side effects. The objective of our study is focused on the use of medicinal plants as anti-inflammatory agents we used a cream based on wax and olive oil and seeds of some medicinal plants at different concentration to study the activities anti-inflammatory drugs in vitro in terms of the effect of hemolysis induced by hypotonic solution on the stabilization of the membrane of red blood cells, the effect of inhibiting the denaturing activity of proteins and the effect of reducing the Cytotoxicity. The evaluation of the cytotoxicity of the cream based on olive oil, the seeds of medicinal plants and the natural wax is carried out in vitro by the use of red blood cells. The cream in our study at concentrations (0.3, 0.2 and 0.15 mg / ml), but superior to the hemolytic effect of gallic acid at the concentration of 0.4 mg / ml. The cream did not exhibit an adverse effect on erythrocytes at low concentrations compared to gallic acid which is used in our work as a benchmark polyphenol.

Tags: inflammation, anti-inflammatories, olive oil, herbal remedies

ملخص

الالتهاب أو التفاعل الالتهابي هو آلية طبيعية تحدث عندما يتعرض الجسم للهجوم: مادة كيميائية ، سامة ، جرثومية ، مؤلمة. الأدوية المضادة للالتهابات (الأدوية المصنعة كيميائياً) لها آثار جانبية. الهدف من دراستنا هو استخدام النباتات الطبية كعوامل مضادة للالتهابات استخدمنا كريم أساسه الشمع وزيت الزيتون وبذور بعض النباتات الطبية بتركيزات مختلفة لدراسة أنشطة العقاقير المضادة للالتهابات في المختبر من حيث: تأثير انحلال الدم الناجم عن محلول ناقص التوتر على استقرار غشاء خلايا الدم الحمراء ، وتأثير تثبيط نشاط تغيير طبيعة البروتينات وتأثير تقليل السمية الخلوية. يتم تقييم السمية الخلوية للكريم بناءً على زيت الزيتون وبذور النباتات الطبية والشمع الطبيعي في المختبر عن طريق استخدام خلايا الدم الحمراء. الكريم في دراستنا بتركيزات (0.3 ، 0.2 و 0.15 مجم / مل) ، ولكنه متفوق على التأثير الانحلالي لحمض الغال بتركيز 0.4 مجم / مل. لم يُظهر الكريم تأثيراً سلبياً

على كريات الدم الحمراء بتركيزات منخفضة مقارنة بحمض الغال الذي يستخدم في عملنا كمعيار بوليفينول.