

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I

Frères Mentouri Constantine I University

Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie animale

قسم بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : *immunologie cellulaire et moléculaire.*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Evaluation de l'effet thérapeutique d'extraits de la plante *Scilla Maritima*
et du pollen sur un modèle d'allergie respiratoire chez le rat

Présenté par : ATTEF Mafez

Le 28/06/2022

BELAGRA Mohamed Malik

BOUYOUCEF Djamil Allaoua

Jury d'évaluation :

Encadreur : EL OUAR Ibtissem (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : TEBANI Fethi (MCB - Université Frères Mentouri Constantine 1).

Examineur 2 : AGGOUNE Cherifa (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire

2021 - 2022

REMERCIEMENTS

LA RÉALISATION DE CE MÉMOIRE A ÉTÉ POSSIBLE GRÂCE AU CONCOURS DE PLUSIEURS PERSONNES À QUI NOUS VOUDRIONS TÉMOIGNER TOUTE NOTRE GRATITUDE.

NOUS VOUDRIONS DANS UN PREMIER TEMPS REMERCIER, NOTRE ENCADRANTE DE MÉMOIRE MADAME EL OUAR. I POUR SA PATIENCE, SA DISPONIBILITÉ ET SURTOUT SES JUDICIEUX CONSEILS, TOUT AU LONG DE LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL, AINSI POUR L'INSPIRATION, L'AIDE ET LE TEMPS QU'ELLE A BIEN VOULU NOUS CONSACRER ET SANS QUI CE MÉMOIRE N'AURAIT JAMAIS VU LE JOUR.

POUR FINIR NOUS ADRESSONS NOS REMERCIEMENTS AUX MEMBRES DU JURY MR TEBANI FETHI ET MME AGGOUNE CHERIFA D'AVOIR ACCEPTÉ D'EXAMINER CE TRAVAIL

NOUS TENONS À EXPRIMER TOUTE NOTRE RECONNAISSANCE À MONSIEUR M.B MOKHTARI QUI PAR SES PAROLES, SES ÉCRITS, SES NOMBREUX CONSEILS ET POUR SON SOUTIEN AU QUOTIDIEN, POUR SA GÉNÉROSITÉ ET SA GRANDE PATIENCE DONT IL A SU FAIRE PREUVE MALGRÉ SES NOMBREUSES CHARGES PROFESSIONNELLES.

NOUS DÉSIRONS AUSSI REMERCIER MONSIEUR (BILLEL) QUI A VEILLÉ À CE QU'ON NE MANQUE DE RIEN AU NIVEAU DU LABORATOIRE ET DE L'ANIMALERIE ET QUI A ÉTÉ LÀ POUR NOUS CONSEILLER.

NOUS EXPRIMONS AUSSI NOTRE EXTRÊME GRATITUDE À LA FAMILLE DU CENTRE DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET PLUS PRÉCISÉMENT À MONSIEUR DJEKOUN QUI NOUS A BIEN ACCUEILLIS.

NOS REMERCIEMENTS VONT ÉGALEMENT À L'ENDROIT DE NOS ENSEIGNANTS, LEUR DISPONIBILITÉ ET LEURS PRÉCIEUX ENSEIGNEMENTS NOUS ONT ÉTÉ D'UNE GRANDE UTILITÉ DURANT NOTRE CURSUS UNIVERSITAIRE.

UNIVERSITÉ DE CONSTANTINE 1, ET À TOUS CEUX QUI ONT CONTRIBUÉ DE PRÈS OU DE LOIN À LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL.

MERCI À TOUS.

DÉDICACES

NOUS DÉDIONS CE TRAVAIL ACCOMPLI DANS LA RIGUEUR, ET L'INTENTION
ÊTRE LE PLUS PRÈS DE L'ESSENTIEL À NOS PARENTS RESPECTIFS POUR LEUR
SOUTIEN, LEUR PATIENCE, LEUR ENCOURAGEMENT DURANT NOTRE PARCOURS SCOLAIRE.
À NOS SŒURS, NOS GRANDS-PARENTS, NOS COUSINS ET COUSINES, NOS ONCLES ET
TANTES, AINSI QU'À TOUS NOS AMIS, QUE DIEU LES GARDES ET LES PROTÈGES.

À NOS FAMILLES : ATTEF, BELAGRA ET BOUYOUCHEF

Résumé

Une allergie est une réaction excessive des bronches à l'intrusion dans l'organisme d'un composant normalement inoffensif de l'environnement appelé allergène. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des bronches qui se manifeste par des accès de gêne respiratoire. Dans le cas de l'asthme allergique, c'est un allergène qui déclenche la crise d'asthme. L'asthme allergique se présente sous forme d'asthme persistant léger, asthme persistant modéré ou asthme persistant sévère en fonction de plusieurs facteurs qui sont : facteurs endogènes et facteurs exogènes. L'objectif de ce travail est de tester l'effet thérapeutique du *S. maritima* et pollen sur l'asthme allergique. L'étude a été réalisée sur des rats Wistar après induction d'asthme allergique au pollen. Nos résultats ont montré que l'extrait du *S. maritima* réduit les scores allergiques chez ces rats ; il affecte le profil électrophorétique des protéines sériques en augmentant les fractions alpha 1 et alpha 2 sur le plan tissulaire l'extrait possède un effet protecteur contre les altérations pulmonaires induites par l'asthme comme la bronchoconstriction et la perte de la structure alvéolaire, cet effet est lié à l'activité antioxydante et anti-inflammatoire.

Mots Clefs : S. maritima, Pollen, Asthme Allergique, Allergène.

Abstract

An allergy is an excessive reaction of the bronchi to intrusion into the body A normally harmless component of the environment called an allergen. Asthma is Chronic inflammatory disease of the bronchi that manifests itself in bouts of discomfort Respiratory. In the case of allergic asthma, it is an allergen that triggers the attack Asthma. Allergic asthma comes in the form of mild persistent asthma, asthma Persistent moderate or severe persistent asthma depending on several factors that are:

Endogenous and exogenous factors. Its diagnosis is made by the treating doctor, and is based on a medical check-up. The objective of this work is to test the therapeutic effect of *S. maritima* on allergic asthma. The study was carried out on Wistar rats after induction an allergic reaction to pollen proteins (allergen). Our results have shown that *S. maritima* extract reduces allergic scores in these rats; it affects the profile Electrophoretic of serum proteins by increasing the alpha 1 and alpha 2 fractions on the tissue plane.

The extract has a protective effect against asthma-induced lung alterations Such as bronchoconstriction and loss of alveolar structure, this effect is related to the activity Antioxidant and anti-inflammatory.

Key words: *S. maritima*, Pollen, Allergic asthma, Allergen

ملخص

الحساسية هي رد فعل مفرط للشعب الهوائية على تسرب مكون غير ضار عادة من البيئة يسمى مسببات الحساسية إلى الجسم. الربو هو مرض التهابي مزمن في الشعب الهوائية يتجلى في نوبات من عدم الراحة التنفسية. في حالة الربو التحسسي، فهو مسبب للحساسية يؤدي إلى نوبة الربو. يأتي الربو التحسسي في شكل ربو مستمر خفيف أو ربو مستمر معتدل أو ربو مستمر شديد اعتمادا على عدة عوامل هي:

العوامل الداخلية والخارجية يتم تشخيصه من قبل الطبيب المعالج، ويستند إلى تقييم طبي. الهدف من هذا العمل هو اختبار التأثير العلاجي للعنصل البحري على الربو التحسسي. أجريت الدراسة على فنران ويستار بعد تحريض رد فعل تحسسي لبروتينات حبوب الطلع (مسببات الحساسية). أظهرت نتائجنا أن مستخلص العنصل البحري يقلل من درجات الحساسية في هذه الفئران؛ فهو يؤثر على المظهر الكهربائي لبروتينات المصل عن طريق زيادة البروتينات المصلية ألفا 1 وألفا 2 على مستوى الأنسجة المستخلص له تأثير وقائي ضد تغيرات الرئة الناجمة عن الربو مثل تضيق الشعب الهوائية وفقدان البنية السخية، ويرتبط هذا التأثير بمضادات الأكسدة والنشاط المضاد للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: العنصل البحري, حبوب الطلع, الربو التحسسي, مسببات الحساسية.

Introduction

1.INTRODUCTION.....	2
---------------------	---

Partie Bibliographique

1. Les Allergies	5
1.1. Définition de l'allergie	5
1.2. Définition de l'allergène	5
1.2.1. Les pneumallergènes	5
1.2.2. Les allergènes alimentaires (Trophallergènes)	6
1.2.3. Les allergènes médicamenteux	6
1.2.4. Les allergènes de contact	7
2. Types de réactions allergiques	7
2.1. Classification des réactions allergiques	7
2.1.1. Classification de Gell et Coombs	7
2.1.2. Hypersensibilité type I	7
2.1.3. Hypersensibilité de type II	8
2.1.4. Hypersensibilité de type III	9
2.1.5. Hypersensibilité de type IV	10
3. L'Asthme	10
3.1. Asthme allergique :	10
3.2. Les caractéristiques de l'asthme allergique	11
3.3. Les facteurs étiologiques	11
3.3.1. Les facteurs prédisposant (atopie)	11
3.4. Mécanismes impliqués dans de développement de l'asthme allergique	12
3.4.1. Phase de sensibilisation	12
3.4.2. Déclenchement de la réaction allergique IgE dépendante	12
3.5. Le rôle des cytokines	15
3.5.1. Chimiokines	15

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique	17
1.1. Rats et élevage	17
1.2. Scilla maritima	17

1.3.Répartition Géographique	18
1.4.Classification systématique	19
1.5.Extrait de pollen :	19
2.Préparation des extraits :.....	20
2.1.Extrait de S. Maritima	20
2.2 L'extrait de pollen	20
3.Traitement des rats :.....	20
3.1.Phase 1 : « Immunisation »	20
3.2.Phase 2 « sensibilisation »	21
3.3.Phase 3 « traitement »	21
4.Evaluation de l'activité antioxydante.....	22
4.1. Capacité de réduction du radical DPPH.....	22
Principe du DPPH.....	22
Dosage FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	23
5.Dosage des protéines sériques par électrophorèse capillaire :	24
6.Réalisation des coupes histologiques	25

Résultats

1.Dosage des protéines.....	Erreur ! Signet non défini.
2.Evaluation des résultats allergiques	29
3.Profil électrophorétique des protéines sériques	31
3.1.Albumine sérique	31
3.2.Fraction alpha-1	31
3.3.Fraction alpha-2	32
3.4.Fraction Beta globuline	33
3.5.Fraction Gamma	34
4.Etude de l'effet de l'extrait de <i>S. maritima</i> sur la structure pulmonaire chez les rats	35
4.1. Structure du tissu pulmonaire du lot contrôle	35
4.2. Structure du tissu pulmonaire du lot allergie	36
4.3. Effet de <i>S. maritima</i> sur la structure histologique du poumon	36
4.4. Structure du tissu pulmonaire du lot pollen	37
4.5. Structure du tissu pulmonaire du lot allergie + S. maritima	38
4.5. Structure du tissu pulmonaire du lot Allergie + pollen	38

Discussion

1.Effet du <i>S. maritima</i> sur les scores allergiques	41
2.Effet du traitement aux <i>S. Maritima</i> et le pollen sur le profil électrophorétique des protéines sériques	42
3. Effet des traitements aux extraits <i>S. martima</i> et pollen sur structures pulmonaires des rats	43
Conclusion et perspective	46
Références	49
Annexe.....	50

LISTE DES FIGURES

Figure 1 physiologie de l'hypersensibilité immédiate	8
Figure 2 physiologie de l'hypersensibilité type II	9
Figure 3 physiologie de l'hypersensibilité type III	9
Figure 4 physiologie de l'hypersensibilité type IV	10
Figure 5 Mécanisme de l'asthme allergique (Holgate 2008)	13
Figure 6 : élevage des rats	17
Figure 7 Scilla maritima	18
Figure 8 Répartition géographique de la plante scilla maritima	18
Figure 9 pollen	19
Figure 10 Injection intrapéritonéale	21
Figure 11 : sensibilisation nasale des rats	21
Figure 12 Administration des extraits par voie orale	22
Figure 13 Réaction du radical DPPH avec un phénol	23
Figure 14 Coloration de la solution Frap	28
Figure 15 Coloration de la solution DPPH	28
Figure 16 Effet des extraits de S. maritima et du pollen sur le taux d'albumine (exprimé en %)	31
Figure 17 Effet des extraits de S. maritima et du pollen sur le taux Fraction alpha-1	32
Figure 18 Effet des extraits de S. maritima et du pollen sur le taux Fraction alpha-2	33
Figure 19 Effet des extraits de S. maritima et du pollen sur le taux Fraction beta globuline.....	33
Figure 20 Effet des extraits de S. maritima et du pollen sur le taux fraction gamma globuline.....	34
Figure 21 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot contrôle (GX40).	35
Figure 22 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot S. maritima (GX40).....	37
Figure 23 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot pollen GX40.	37
Figure 24 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot allergie + S. maritima.....	38
Figure 25 structure cellulaire d'une bronchiole	44

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 Comparaison des différents types d'hypersensibilité	14
Table 2 Classification scientifique de S. maritima	19
Table 3 Evaluation quotidienne de la réaction allergique chez les rats du lot 4	29
Table 4 Evolution quotidienne de la réaction allergique chez les rats du lot 5	29
Table 5 Evaluation quotidienne de la réaction allergique chez les rats du lot 6	30

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

L'hypersensibilité ou réaction allergique est une réaction excessive du système immunitaire à des antigènes inoffensifs. Les antigènes environnementaux qui provoquent cette réaction sont appelés allergènes. Cette réaction peut être respiratoires, cutanées ou digestives, selon la voie d'exposition à l'allergène **(Parham, 2003)**. Par définition, une allergie est une réponse immunitaire accrue à un antigène inoffensif. Cette réponse conduit à une réponse inflammatoire constituée de nombreux mécanismes physiologiques qui répondent aux agressions de l'organisme, favorisant la concentration des défenses, neutralisent et éliminent efficacement l'agent agresseur, puis réparent les lésions. **(Amouzou et Maiga, 2014)**.

L'asthme est une maladie respiratoire, qui représente actuellement la majorité de l'absentéisme scolaire et professionnel et modifie la qualité de vie des patients de tous âges. Son coût est toujours élevé et en constante augmentation. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre de patients asthmatiques en Afrique et dans d'autres pays du monde continue de croître, approchant les 300 millions. Ces statistiques ont conduit à l'élaboration d'un consensus international sur le traitement de l'asthme, qui a ensuite conduit à la position de l'OMS de prêter attention à cette condition et de proposer des mesures préventives **(Youcef et Zeggane, 2016)**.

En Algérie, la prévalence de l'asthme varie entre 4% et 6% chez l'adulte et entre 8% et 10% chez l'enfant. Il est devenu aujourd'hui un problème de santé publique qui pourrait être exacerbée par de multiples interactions entre polluants et allergènes dans l'habitat (tabagisme passif) ou dans l'air (pollution automobile particulièrement) **(Youcef et Zeggane, 2016)**.

La prise en charge thérapeutique de l'asthme repose sur la prise régulière de médicaments visant trois aspects fondamentaux impliqués dans le processus physiopathologique de l'asthme : la broncho constriction, l'inflammation et les mécanismes cellulaires spécifiques. **(Sanchez, 2015)**.

Les bronchodilatateurs inhalés comme les bêta2-mimétiques ou agonistes des récepteurs bêta2-adrénergiques sont classés en deux catégories selon leur durée d'action. Les bronchodilatateurs inhalés d'action rapide constituent le traitement de la crise et de l'exacerbation asthmatique. Leur action pharmacologique est immédiate et leur durée d'action s'étend de 4 à 6 heures. Les bronchodilatateurs inhalés de longue durée d'action (jusqu'à 12 heures) sont utilisés comme traitement de fond de l'asthme, en complément d'un

anti-inflammatoire inhalé. Les anticholinergiques ont eux aussi une action bronchodilatatrice, mais elle est moins rapide et moins importante qu'avec les bronchodilatateurs inhalés d'action rapide. **(Sanchez, 2015)**.

Plusieurs classes thérapeutiques agissent sur l'inflammation. Les corticoïdes inhalés sont utilisés comme traitement de fond, régulier, afin de prévenir la survenue et limiter l'intensité des crises et des exacerbations, grâce à leur action anti-inflammatoire. Les corticoïdes oraux ne peuvent être utilisés qu'en cures courtes, au cours des exacerbations sévères. Cependant, l'utilisation quotidienne de ces derniers provoque de nombreux effets secondaires tels que la prise du poids, troubles ostéoarticulaires, diabète secondaires, troubles trophiques cutanées et insomnie et affectent quantitativement, et surtout qualitativement, le système immunitaire. Ils ont également un effet délétère sur les acteurs de la réponse inflammatoire. Ces constatations rendent plausible l'existence d'une association entre complication infectieuse et corticothérapie. . . **(Sanchez, 2015)**.

De ce fait la recherche de nouvelles molécules ayant moins d'effet secondaire avec un meilleur effet thérapeutique est devenue une nécessité.

Ces dernières années, l'intérêt porté à la biothérapie et la recherche de nouvelles molécules bioactives a augmenté considérablement. Les plantes ont constitué depuis longtemps la source principale des molécules bioactives. **(Le Clainche, 2020)**.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail, est de tester l'efficacité d'un traitement à base de deux types d'extraits, un extrait de la plante *Silla maritima* et un l'extrait du pollen, sur un modèle d'asthme allergique induit chez les rats. Dans un premier temps nous allons tester l'activité anti oxydante des deux extraits, puis nous procédons au développement d'un modèle d'allergie respiratoire chez les rats sur lequel nous allons tester l'effet de nos extraits sur le profil électrophorétique des protéines sériques et l'histologie du tissu pulmonaire

Partie
Bibliographique

1. Les Allergies

1.1. Définition de l'allergie

Le terme allergie a été proposé pour la 1ere fois par Von Pirquet en 1906 pour décrire la réactivité modifiée d'un organisme au contact de substances aussi diverses que les bacilles tuberculeux, le vaccin contre la variole, les toxines et le sérum. La définition de Von Pirquet était large en ce sens qu'elle incluait à la fois l'hypersensibilité et l'hyposensibilité mais d'autre part elle était limitée aux cas d'hypersensibilité résultant d'une exposition au réactif ou l'allergène (**Krifi, M. N,2018**). L'allergie est une réaction anormale, inadaptée, exagérée du système immunitaire, consécutive à un contact avec une substance étrangère à l'organisme (l'allergène) avec laquelle il a été une première fois en contact.

1.2. Définition de l'allergène

Les allergènes sont des substances qui sont habituellement bien tolérées, mais considérées à tort comme dangereuses par notre système immunitaire. Ainsi, une substance tout à fait inoffensive pour certains peut provoquer une réaction allergique chez une personne sensibilisée. Cette réaction se manifeste sous forme d'asthme, de rhinite, d'urticaire, d'œdème ou encore de conjonctivite.

L'allergène est un antigène qui entraîne la production d'IgE chez les individus génétiquement prédisposés. Il s'agit le plus souvent de protéines très conservées au cours de l'évolution des espèces, comme les protéines enzymatiques (**Fadlou-Allah, 2007**).

1.2.1. Les pneumallergènes

Ce sont des substances capables de déclencher une réaction allergique lorsqu'elles sont inhalées au niveau de voies respiratoires, c'est-à-dire sont responsables de manifestations allergiques ORL (rhinite), pulmonaires (asthme, alvéolite) et de conjonctives.

- Les pneumallergènes de grandes tailles $>10\mu$ provoquent rhinites et conjonctives.
- Les pneumallergènes $<4\mu$ peuvent atteindre les alvéoles allergiques. Les pneumallergènes peuvent être saisonniers comme les pollens de graminées, d'arbre et d'herbacés, et les calendriers polliniques. Ou pré-annuels tels que les acariens, les pneumallergènes d'animaux

domestiques de bactéries ou de champignons opportunistes (*aspergillus*) et non opportunistes (*trichophyton*) (**Boumaza et al, 2010**).

1.2.2. Les allergènes alimentaires (Trophallergènes)

Ce sont des Antigènes absorbés par voie digestive et capables de déclencher une réaction immunologique. Les allergènes diffèrent généralement selon l'âge d'hommes ; ainsi l'enfant est beaucoup plus sensible à l'arachide et aux protéines du lait de vache et de l'œuf (**Sellate, 2015**). Quant à l'adulte, les allergènes sont d'origine végétale et en particulier les rosacées (abricots, cerises, fraises, framboises, noisettes, pêches, poires, pommes, prunes, ...) et les fruits dits du groupe latex (bananes, avocats, châtaignes, kiwis, ...), sont le plus souvent incriminés (**Morin, 2012**). Les allergènes d'origine animale (poisson de mer, crustacés, moules, huîtres) sont responsables de manifestation digestive (5% des cas) mais surtout cutanéomuqueuse (80% des cas), systématique (choc 5% des cas), ou respiratoires oculaires ou autres (10% des cas) (**Boumaza et al, 2010**).

1.2.3. Les allergènes médicamenteux

Les médicaments sont des substances capables de déclencher des allergies. Le médicament peut être allergisant du fait sa molécule active, des protéines qui sont combinées avec cette molécule ou encore par la présence de certains additifs. Ils sont responsables d'hypersensibilités allergiques survenant le plus souvent de manière imprévisible et nécessitant une réadaptation du traitement (**Demoly et al., 2014**). Ces allergènes sont contenus surtout dans les médicaments utilisés en application locale, absorbés par la bouche (certains antibiotiques) ou injectés d'un oligo-élément (iode). Les groupes de médicaments les plus fréquemment en cause sont les antibiotiques (les pénicillines, en particulier) et les myorelaxants (Les curarisants, en particulier). Les sulfamides ont également été à l'origine de nombreuses réactions allergiques, tandis que les anti-inflammatoires et antalgiques sont responsables d'une grande part de réactions pseudo-allergiques (**Mekhalfia et al., 2020**).

1.2.4. Les allergènes de contact

La peau comme les muqueuses respiratoires représente une interface avec le milieu extérieur et peut ainsi être exposée à des allergènes de contact. Ces derniers pénètrent par la peau et concernent, entre autres, les produits ménagers, les cosmétiques, les fibres animales dans les textiles (laine), les métaux qui entre dans la composition des boutons, des ceintures, des bijoux, les débris des bactéries détruites lors de la désinfection des lentilles de contact, etc. La réaction cutanée (ou dermite allergique) la plus courante est l'eczéma. **(Demoly et al., 2014)**

2. Types de réactions allergiques

A partir du type d'envahisseur, le système immunitaire peut opposer deux types de réactions aux antigènes qui sont humorale et cellulaire et à partir de la nature de la maladie allergique la plus courante, le système immunitaire doit réagir d'une manière trop importante et se traduira de différentes réactions lors des contacts ultérieurs. Les plus courantes sont classées en quatre types.

2.1. Classification des réactions allergiques

2.1.1. Classification de Gell et Coombs

En 1945, deux immunologistes britanniques Gell et Coombs, ont classifié les réactions d'hypersensibilité (HS) en quatre grands types, selon la forme d'action et le temps de réponse, après réintroduction de l'antigène et en fonction des médiateurs impliqués. Cette classification reste cependant majoritairement admise en dépit de modifications proposées. Cette classification bien qu'ancienne fait encore référence **(Gérald, 2011 ; Entringer, 2009, Mondoulet, 2005)**.

2.1.2. Hypersensibilité type I

Elle est représentée essentiellement par l'anaphylaxie et l'allergie immédiate. Le délai de réponse est très court, parfois quelques minutes. Lors de la réaction Ag-Ac induite par la réintroduction de l'Ag des médiateurs chimiques sont libérés dont l'histamine qui provoque des manifestations caractérisées par des contractions de fibres musculaires lisses, une augmentation de la perméabilité capillaire et une vasodilatation. **(Battisti, O ,2010)**

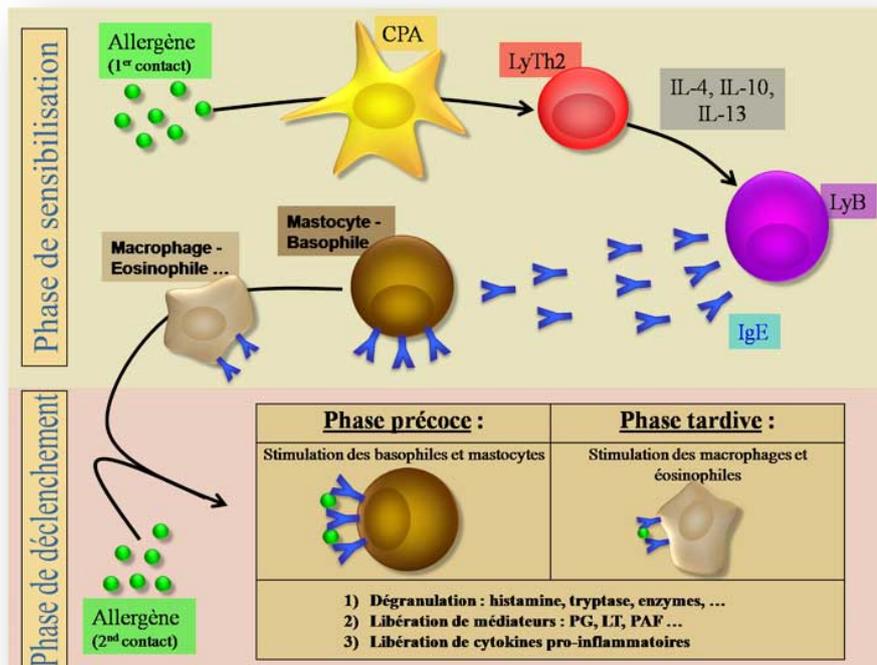


Figure 1 physiologie de l'hypersensibilité immédiate

2.1.3. Hypersensibilité de type II

Elle est moins fréquente et de nature cytotoxique faisant intervenir les anticorps IgG et IgM. Elle est responsable des réactions transfusionnelles, de l'incompatibilité foeto-maternelle, d'anémies hémolytiques et de certaines intolérances médicamenteuses, (**Battisti, O ,2010**)

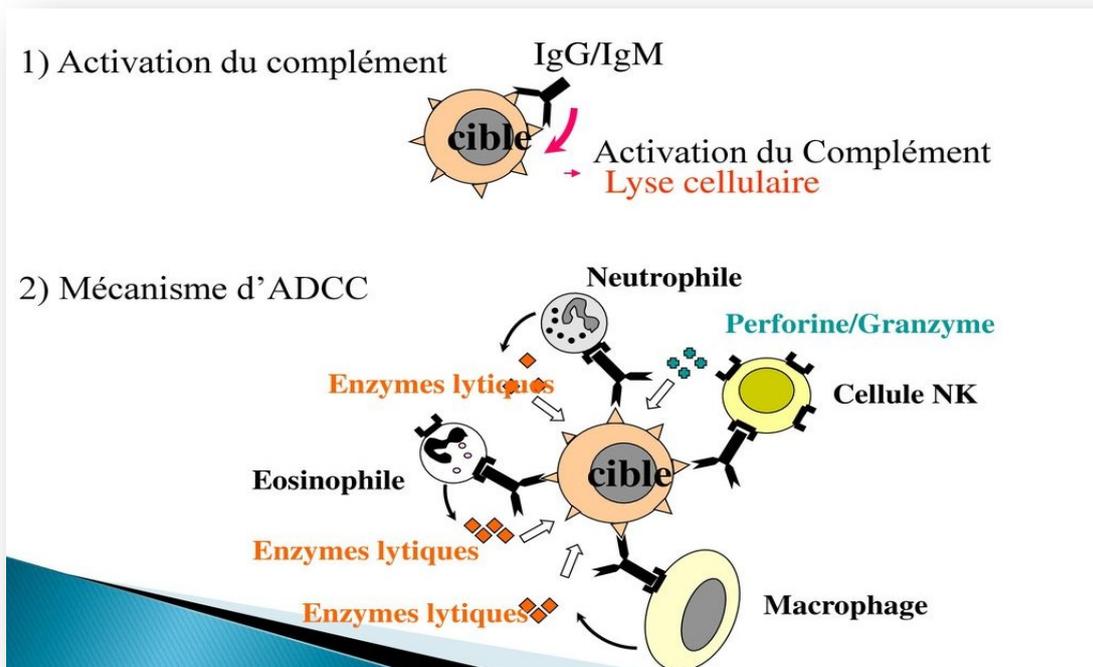


Figure 2 physiologie de l'hypersensibilité type II

2.1.4. Hypersensibilité de type III

Elle fait intervenir les anticorps IgG et responsable des glomérulonéphrites, du lupus érythémateux disséminé et d'une forme de maladie pulmonaire, l'alvéolite allergique (poumon de fermier, maladie des éleveurs d'oiseaux), ainsi que du gonflement de la peau lors des rappels de vaccination, **(Battisti, O ,2010)**

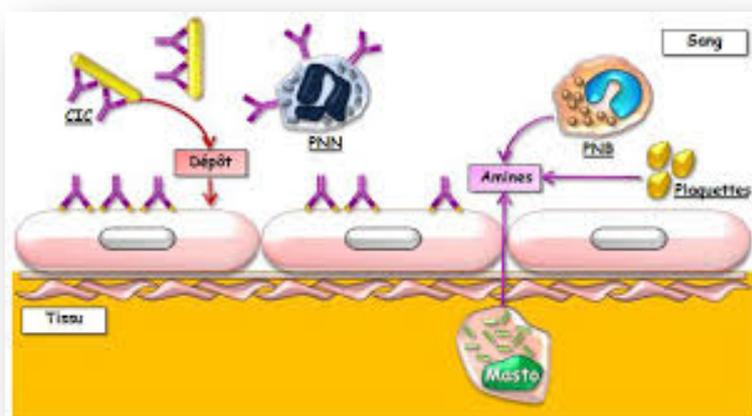


Figure 3 physiologie de l'hypersensibilité type III

2.1.5. Hypersensibilité de type IV

C'est une réaction cellulaire retardée, responsable de dermatoses allergiques, consécutives au contact de la peau avec certaines matières (nickel, caoutchouc, détergents, cosmétiques) et de granulomes (tuberculose, sarcoïdose), ainsi que de rejet d'un organe greffé, (Belarif, 2017).

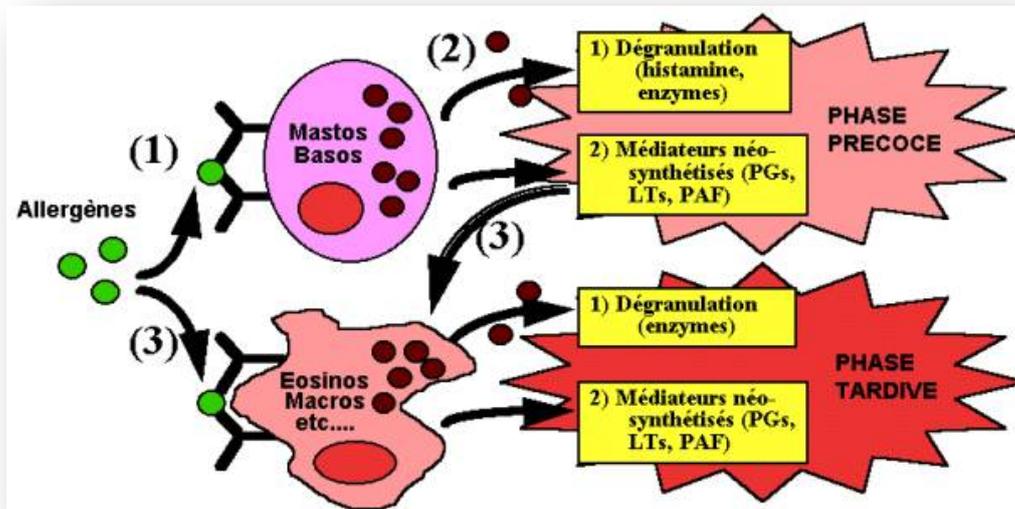


Figure 4 physiologie de l'hypersensibilité type IV

3. L'Asthme

3.1. Asthme allergique :

Se définit comme une réaction excessive des bronches contre un allergène. Elle se distingue le plus souvent par une dyspnée (gêne respiratoire), sifflante, paroxystique et une obstruction bronchique (bronchospasme, œdème, hypersécrétion) qui est généralement réversible spontanément ou sous l'effet du traitement.

Chez les personnes prédisposées, l'inflammation chronique due à l'asthme allergique entraîne des crises récidivantes d'obstruction bronchique (diminution du calibre des bronches) avec essoufflement, toux et sifflement dans la poitrine (ou sibilants) surtout la nuit et au petit matin, ainsi qu'une hyperréactivité bronchique (HRB) (Chateaux, 2005). L'asthme allergique représente, de nos jours, un problème majeur de santé publique qui concerne toutes les classes d'âge, avec une prévalence en nette augmentation ces 30 dernières années, notamment dans les pays industrialisés. L'OMS estime qu'en 2025, avec les tendances actuelles, plus de 400 millions de personnes seront asthmatiques (Wao, 2013).

3.2. Les caractéristiques de l'asthme allergique

L'asthme est caractérisé par une obstruction diffuse des voies aériennes d'où une difficulté à respirer résultantes de :

- L'hyperréactivité bronchique (HRB) : c'est l'aptitude des bronches à s'obstruer (bronchospasme) sous l'influence d'un stimulus quelconque (allergène, etc.) qui à des concentrations 10, 20, 100 fois plus élevées, ne causeront aucun désagrément à un individu normal. Il est fortement probable que l'HRB soit un phénomène génétique **(Grini et Saddek, 2008)**.
- L'hyperréactivité bronchique : est donc nécessaire mais non suffisante pour définir l'asthme.
- L'inflammation bronchique : accompagnée d'altérations de l'épithélium perd alors son effet de barrière vis-à-vis des allergènes et de nombreux médiateurs.

Les symptômes de l'asthme sont en relation directe avec l'HRB et l'inflammation bronchique **(Boumaza et al, 2010)**.

3.3. Les facteurs étiologiques

3.3.1. Les facteurs prédisposant (atopie)

Les maladies de type allergique sont souvent familiales. Le terme atopie désigne une tendance à l'hyperproduction d'anticorps de type IgE contre des allergènes communs de l'environnement. Environ 80 % des individus atopiques ont des antécédents familiaux d'allergie contre 20% seulement dans la population normale **(Chapel et al, 2004)**. Le taux global des IgE sériques, la production des IgE spécifiques et la réactivité bronchique excessive dépendent tous trois d'un contrôle génétique. Des gènes situés sur le chromosome 5 appelé le groupe dit du gène de l'IL-4 sont impliqués dans la régulation de la production d'IgE. Ainsi que des gènes situés sur le bras long du chromosome 11 contrôlant le phénotype atopique. **(Chapel et al, 2004)**

Ces IgE se fixent dans les tissus et entraînent, en présence de l'allergène, la dégranulation des basophiles et des mastocytes. Les cellules produisant les IgE sont surtout localisées dans les formations lymphoïdes des muqueuses du nez, de la trachée, des bronches et de l'intestin **(Bach et Lesavre, 1986)**.

Les facteurs génétiques de susceptibilité pour l'atopie ont été mis en évidence par des études familiales démontrant un taux de concordance supérieur chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes **(Tremblay,2009)**.

3.4. Mécanismes impliqués dans le développement de l'asthme allergique

3.4.1. Phase de sensibilisation

La première phase est une étape de sensibilisation vis-à-vis d'un allergène. Cette étape survient le plus souvent pendant la petite enfance. Cette sensibilisation résulte de la présentation d'un allergène aux cellules T CD4 par les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans de la peau. La présentation de l'allergène (acariens de la poussière et phanères) active les lymphocytes T CD4 qui se différencient en lymphocytes dits Th2 qui produisent de l'IL4 et de l'IL5. L'IL4 contribue à la différenciation des LB en plasmocytes et induit une production d'IgE par ces plasmocytes. Une sensibilisation est une condition nécessaire mais pas suffisante pour qu'une maladie atopique s'exprime. **(Blanc ,2008)**

3.4.2. Déclenchement de la réaction allergique IgE dépendante

La deuxième phase est une étape effectrice responsable des manifestations allergiques. Elle survient à l'occasion d'un nouveau contact avec l'allergène. Elle se décompose elle-même en deux phases : la phase aigüe et la phase inflammatoire.

- La phase aigüe résulte d'une réaction d'hypersensibilité immédiate : l'allergène interagit avec les IgE préformées fixées sur les récepteurs de haute affinité pour les IgE (FCεRI) sur les mastocytes. Ces cellules libèrent des médiateurs contenus dans des granules principalement l'histamine ou synthétisés à partir des phospholipides membranaires comme les leucotriènes et le PAF qui sont responsables de la phase aigüe. Cette phase est caractérisée par une vasodilatation, un œdème, une hypersécrétion de mucus et une contraction des muscles lisses.

-La phase inflammatoire est due à l'enrôlement local d'éosinophiles mais également de macrophages, secondaire à la libération de cytokines et de chimiokines par les basophiles. Son expression clinique est inconstante. **(Chemelle ,2010)**

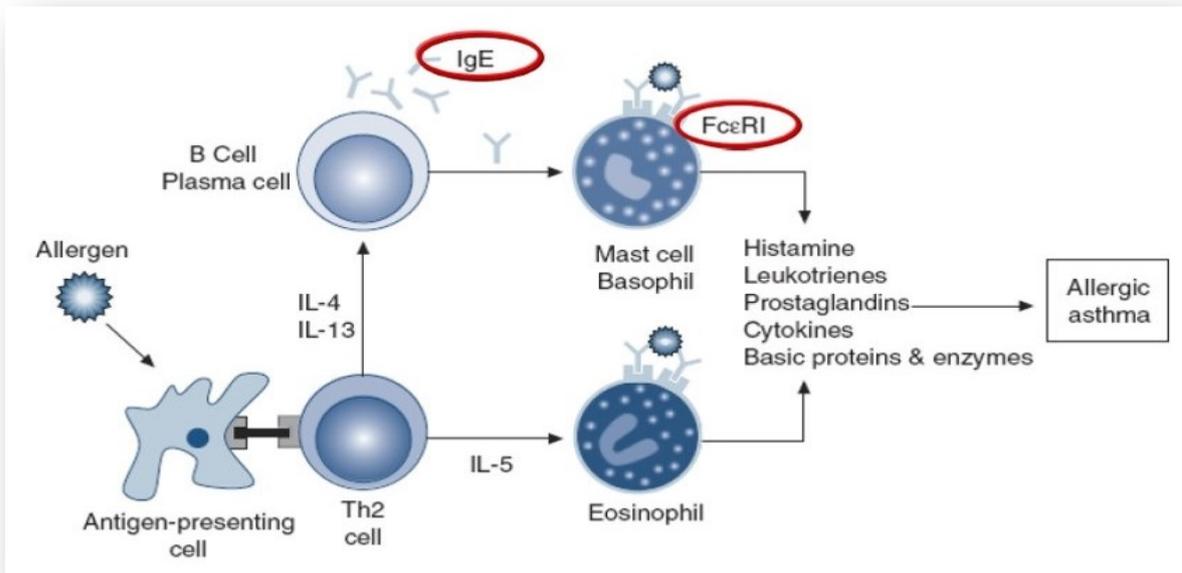


Figure 5 Mécanisme de l'asthme allergique (Holgate 2008)

Table 1 Comparaison des différents types d'hypersensibilité

Caractéristiques	Type I (anaphylactique)	Type II (Cytotoxique)	Type III (Complexes immuns)	Type IV (Retardée)
Anticorps	IgE	IgG,IgM	IgG,IgM	Aucun
Antigène	Exogène	Surface cellulaire	Soluble	Tissus et organes
Temps de réponse	15-30 min	Minutes- Heures	3-8 heures	48-72 heures
Aspect	Papules et érythème	Lyse et nécrose	Erythème, œdème et nécrose	Erythème et induration
Histologie	Mastocytes et éosinophiles	Anti corps et complément	Complément et neutrophiles	Monocytes et lymphocytes
Transféré par	Anticorps	Anticorps	Anticorps	Cellules T
Exemples	Asthme allergique, rhume des foins	Maladie du goutte Pasture	Maladie du poumon d'éleveurs d'oiseaux	Maladie tuberculine

3.5. Le rôle des cytokines

Les cytokines jouent un rôle majeur dans le maintien et l'amplification de la réponse inflammatoire dans l'asthme. Il existe plusieurs cytokines et chimiokines qui sont impliquées dans la physiopathologie de l'asthme

- IL-4 : Joue un rôle majeur dans la différenciation des Th0 en Th2. Il peut être impliqué dans la sensibilisation aux allergènes. Son rôle est nécessaire dans la transformation des cellules B qui produisent des IgG en celles qui produisent des IgE (**Leung et al. 1995**).
- IL-5 : Joue un rôle dans l'inflammation indirecte induite par les éosinophiles, lié principalement à la différenciation des cellules précurseurs de la moelle osseuse ainsi qu'à la prolongation de la survie des éosinophiles (**Dente Flet al., 2010**).
- IL-9 : Joue un rôle important dans la différenciation et la prolifération des mastocytes ainsi que dans l'interaction synergique avec la SCF.
- IL-12 : Joue un rôle important dans la différenciation et l'activation des Th1, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules épithéliales des voies aériennes (**Trinchieri et al. 2003**).
- IL-13 : Comme L'IL-4, l'IL-13 peut stimuler la transformation des mastocytes en produisant les IgE et en modifiant la structure des voies aériennes sans avoir de rôle dans la différenciation des Th2. Le rôle de l'IL-13, en particulier dans l'asthme sévère a été confirmé (Naseer et al, 1997).
- IL-17 : a un rôle important dans les maladies inflammatoires. Elle est régulée par le facteur de transformation ROR-gt (retinoic acid orphan receptor-gt). Les autres interleukines telles que l'IL-6, l'IL-1b, le TGF-b, et l'IL-23 sont impliquées dans la différenciation de Th17 chez l'homme. Le rôle de l'IL-17 dans l'asthme est encore peu connu (**Bullens et al, 2006**).

3.5.1. Chimiokines

Toutes les chimiokines exercent leurs fonctions en se fixant sur des récepteurs couplés aux protéines G. certaines chimiokines sont considérées comme pro inflammatoires. La sécrétion de ces chimiokines peut être induite lors de la réponse immune afin de favoriser l'arrivée de cellule du système immunitaire au niveau d'un site infectieux. D'autres chimiokines sont impliquées dans le contrôle de la migration de cellules au cours des processus de maintenance tissulaire ou au cours du développement.

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Rats et élevage

L'étude a été réalisée, au niveau de l'animalerie du centre de recherche en sciences pharmaceutiques- Constantine, sur 24 rats femelles de souche Wister Albinos âgés de 2 mois. Les rats sont élevés dans des cages en polypropylène à une température à 25C et une photopériode de 12h jour/12h nuit. Les animaux ont un accès libre à la nourriture et l'eau.



Figure 6 : élevage des rats

1.2. Scilla maritima

Scilla maritima « L'oignon de mer » est une plante méditerranéenne dont le poids est de 5 à 7 kg, formée d'écailles emboîtées que l'on appelle Squames de couleur blanchâtre Scilla d'Italie ou rougeâtre dites Scilla d'Espagne, les écailles externes sont unies et membranaires, les écailles moyennes épaisses et charnues la tige fleurée porte à son extrémité une grappe de petites fleurs blanches à Corole en étoile.



Figure 7 *Scilla maritima*

1.3. Répartition Géographique

La plante est spontanée sur les rivages sablonneux du pourtour méditerranéen, elle pousse de l'Atlantique au moyen-orient, elle est plus présente en Algérie plus dans les forêts littorales, les lieux rocaillieux, les cotes secs, les pâturages

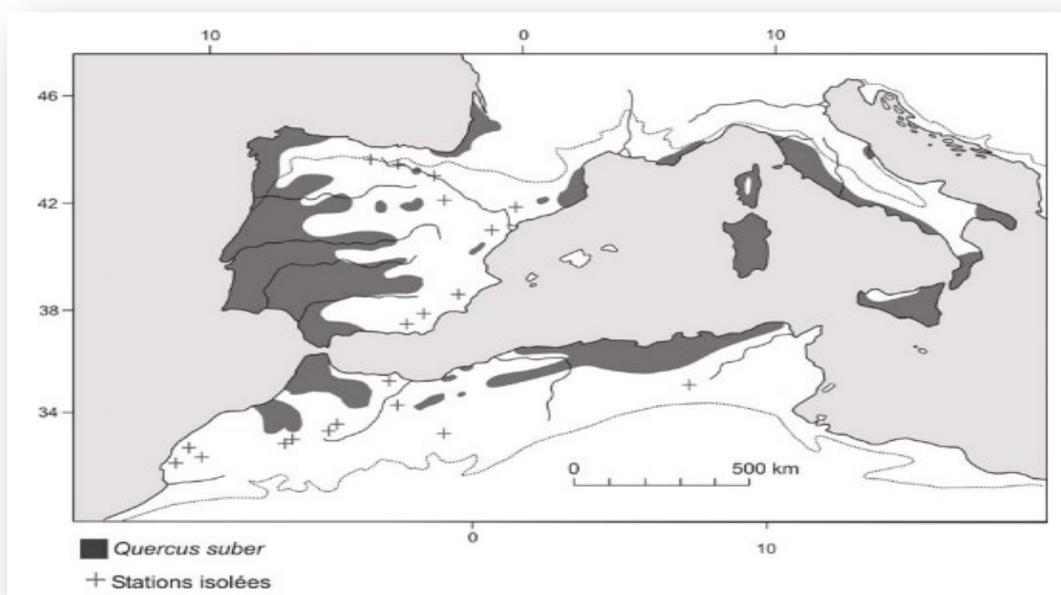


Figure 8 Répartition géographique de la plante *S. maritima*

1.4. Classification systématique

Table 2 Classification scientifique de *S. maritima*

Règne	Plantae
Classe	Monocotyledoneae
Ordre	Asparagale
Famille	Asparagaceae (liliacée)
Genre	Urginea L.
Espèce	<i>Scilla Maritima</i>

1.5. Extrait de pollen :

Pollen désigne un ensemble de grains microscopique produits par les étamines et qui représentent les éléments males des végétaux à fleurs. Quand le pollen est transporté par le vent ou par les insectes, il germe sur le stigmate du pistil.



Figure 9 pollen

2. Préparation des extraits :

2.1. Extrait de *S. Maritima*

Les graines de la plante *S. maritima* sont prélevées après la période de fleuraison et séchées dans un endroit aéré sec et à l'abri des rayons de solaire. Ils sont ensuite broyés (dont la masse est de 146 g) et macérées dans 100 ml de méthanol. Après la première 48h, la filtration est réalisée à l'aide d'un papier filtre (l'extraction est répétée 2 fois). Finalement, l'extrait brut (de poids de 12.6907 g) obtenue est conservé au frais jusqu'à l'utilisation.

2.2 L'extrait de pollen

L'extraction de pollen se fait de la même manière que l'extraction précédente. Brièvement, 100 g de pollen sont macérés dans 100 ml d'éthanol. Après 48h l'extrait est filtré et conservé au frais jusqu'à l'utilisation.

3. Traitement des rats :

Le traitement des rats s'effectue en 3 phases une phase de développement de l'asthme chez les rats, une phase de sensibilisation et une phase de traitement à l'extrait de plante ou de pollen.

Les rats sont répartis en six lots ; chaque lot contenant 4 rats :

- Lot -1- « contrôle » : ne reçoit aucun traitement
- Lot -2- « *S. maritima* » : reçoit de l'extrait de *S. maritima*
- Lot -3- « pollen » : reçoit de l'extrait du pollen
- Lot -4- « allergie » : reçoit une dose ovalbumine pendant 4 semaines
- Lot -5- « allergie + *S. maritima* » : reçoit une dose d'ovalbumine pendant 4
- Lot -6- « allergie + pollen » : reçoit une dose d'ovalbumine pendant 4 semaines

Plantes Utilisées

3.1. Phase 1 : « Immunisation »

Cette étape permet de provoquer une réponse immunitaire contre les protéines du pollen.

Les rats reçoivent une dose d'ovalbumine de 10mg/kg par voie intrapéritonéale à raison d'une dose semaine pendant 4 semaines.



Figure 10 Injection intrapéritonéale

3.2. Phase 2 « sensibilisation »

Les rats des lots 4, 5, et 6 (allergie, allergie+S. maritima ,allergie+pollen) reçoivent 10ul des protéines du pollen par nasale pendant 4 jours



Figure 11 : sensibilisation nasale des rats

3.3. Phase 3 « traitement »

Les rats des lots 5 et 6 sont traités soit par 1 ml l'extrait de *S. maritima* (avec une dose 100g/kg) soit par l'extrait de Pollen (avec une dose de 200 mg/kg) par voie orale. Les scores allergiques sont évalués chaque jour après le traitement.



Figure 12 Administration des extraits par voie orale

A la fin de la phase du traitement les rats sont disséqués, le sérum prélevé est conservé à -20. Les organes sont conservés en dans le formol 10%.

4. Evaluation de l'activité antioxydante

4.1. Capacité de réduction du radical DPPH

Principe du DPPH

Le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 m. La méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant visualisé également par un changement de coloration de la solution qui vire du violet au jaune.

La première étape est la capture d'un atome d'hydrogène du composé phénolique par le radical

DPPH pour donner du diphénylhydrazine et un radical phénoxy (Figure V.3). Cette étape est

La première d'une série de réactions telles que des fragmentations, additions, ou autres qui peuvent éventuellement influencer les résultats, notamment les cinétiques de la capture du DPPH par le composé testé.

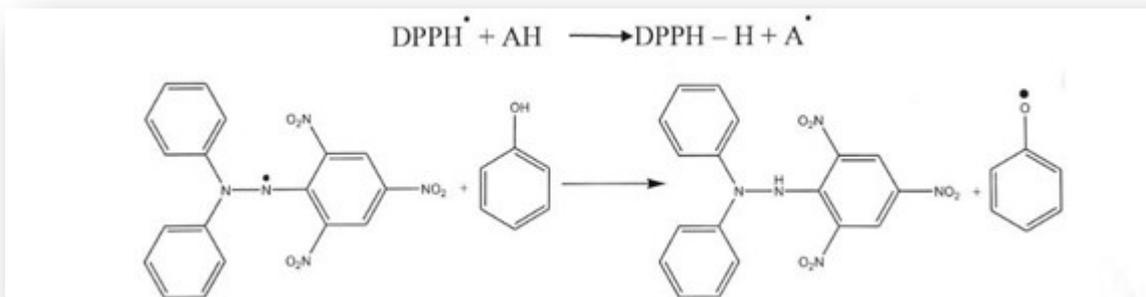


Figure 13 Réaction du radical DPPH avec un phénol

Les mesures de l'absorbance du DPPH de nos extraits permettent de déterminer le pourcentage D'inhibition en appliquant l'équation suivante.

$$\text{IC}_{50}(\%) = ((\text{Abs contrôle} - \text{Abs échant}) / (\text{Abs contrôle})) * 100$$

IC₅₀(%) : Pourcentage d'inhibition.

Abs contrôle : absorbance de contrôle négatif.

Abs échant : absorbance de l'échantillon (nos extraits).

Méthode :

La méthode DPPH est réalisée en suivant les étapes ci-dessous :

Une solution DPPH de 0,2 mM dans le méthanol est mélangé avec 1 ml de chacun des extraits *S. Maritima* et pollen à différentes concentrations (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml). L'acide ascorbique est utilisé comme standard.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 517 m après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Dosage FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Un volume x mL de solution antioxydante ont été ajoutés (1 - x) ml d'EtOH (96 %), 2,5 ml de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml de solution K₃Fe(CN)₆ (1 %) ; la solution a été incubé à 50 °C au bain-marie pendant 20 min. Après refroidissement à température ambiante et 2,5 ml de TCA (10 %) ont été ajoutés. Une aliquote de 2,5 ml a été prélevée et mélangé avec 2,5 ml d'eau et 0,5 ml de solution de FeCl₃-6H₂O (0,1 %). L'absorbance de la solution de bleu de Prusse résultante s'effectue à 700 nm.

5. Dosage des protéines sériques par électrophorèse capillaire :

La séparation électrophorétique des protéines a été réalisée à l'aide de l'appareil SEBIA CAPILLARYS 2, qui utilise un tampon alcalin pour séparer les protéines sériques en 6 fractions principales (albumine, alpha1 globuline, alpha 2 globuline, beta 1 globulin, beta 2 globuline et gammaglobuline). Chaque fraction, à l'exception de l'albumine, contient au moins 2 composants. La proportion relative de ces différentes fractions peut aider à établir un diagnostic et un pronostic pour certaines pathologies.



Figure 19 : automate SEBIA CAPILLARYS 2 conçu pour l'électrophorèse capillaire

6. Réalisation des coupes histologiques

La réalisation de coupes histologiques comporte 8 étapes successives ; la déshydratation, l'inclusion ou l'enrobage, la coupe au microtome, fixation de la coupe sur la lame, le déparaffinage, la réhydratation, la coloration de la coupe et enfin le montage.

- **La déshydratation :**

Les fragments d'organes fixés précédemment sont placés des cassettes. Ces dernières sont immergées dans des bains d'alcool à concentration croissante (70°, 85°, 90°, 100° pendant 10, 30, 45 et 1h :30 min respectivement).

- **Inclusion et enrobage :**

Les cassettes sont enrobées dans de la paraffine fondue dans des moules métalliques (la paraffine est chauffée pendant 1h dans une étuve à 56°C et 60°C). Le moule est ensuite fermé et placé dans un congélateur pour refroidir la paraffine et faciliter le démoulage.

- **Coupe au microtome :**

Après refroidissement de la paraffine, les échantillons sont démoulés des cassettes. Les blocs de paraffine obtenue sont ensuite dégrossés à la main et coupé à l'aide d'un microtome en coupes fine de 3µm d'épaisseur. Enfin, les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

- **Fixation de la coupe sur la lame :**

Sur une plaque chauffante maintenant une température de 50°C, on place une lame sur laquelle on dispose une solution d'eau distillée albuminée à 1% en veillant à faire un dôme d'eau sur la lame pour éviter les bulles d'air. L'eau albuminé permet à la coupe de bien glisser sur la lame, on dépose alors la coupe histologique sur la lame. On égoutte la lame, en renversant simplement l'eau en excès sur un sopalin, on place la lame de façon droite pour bien la faire sécher puis on met la lame dans une étuve à 56°C pendant 1h. Cela permettra d'enlever le reste de la paraffine plus facilement et de bien fixer la coupe sur la lame.

- **Déparaffinage :**

Ce fait en passant les lames dans 2 bains successifs de toluène pendant 2 min.

- **Réhydratation :**

La réhydratation des coupes histologiques passe par plusieurs bains d'alcool avec une concentration décroissante 100°, 80°, 50° pendant 2 min chacun.

Pour terminer les lames sont rincées d'eau du robinet pendant quelques secondes.

- **Coloration des coupes histologiques :**

Les lames sont immergées dans un bain d'hématoxyline pendant 5 min, puis rincer à l'eau. Elles sont de nouveau trempées dans un autre bain d'éosine pendant 3 min et laver à l'eau distillé. La première coloration permet de colorer les noyaux alors que la seconde colore le cytoplasme en rose.

2 autres bains d'alcool à 95% et 100% pendant 1 min chacun va permettre d'enlever les résidus de colorant restants dans les lames.

- **Montage et lecture des lames**
- **Observation au microscope**

Résultats

1. Etude du pouvoir anti oxydant des deux extraits

Les résultats montrent que les deux extraits ont un pouvoir antioxydant les valeurs EC50 sont de l'ordre de 0.4 mg/ml et 0.2 mg/ml d'extrait de pollen et de *S. maritima*. (fig.14, fig.15)



Figure 14 Coloration de la solution FRAP

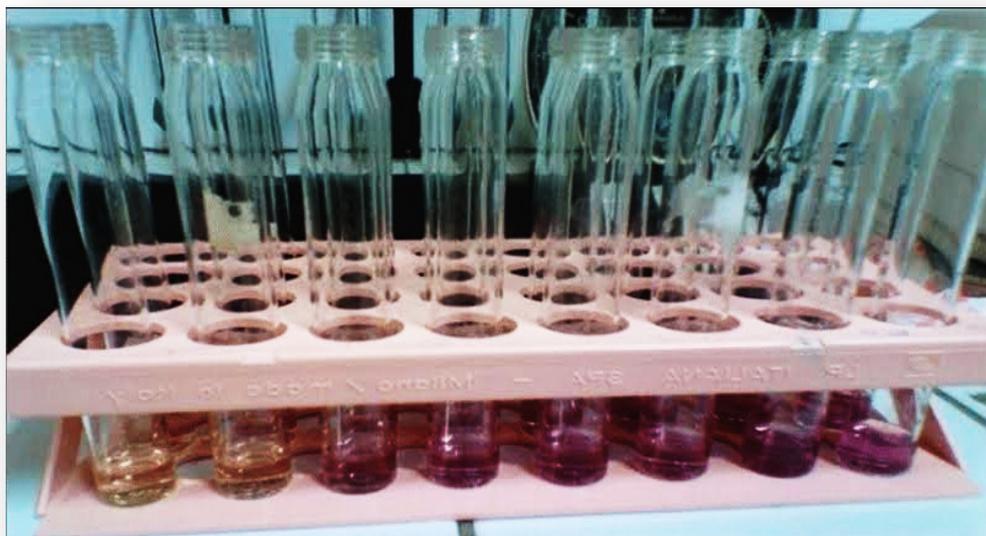


Figure 15 Coloration de la solution DPPH

2. Evaluation des résultats allergiques

Table 3 Evaluation quotidienne de la réaction allergique chez les rats du lot 4

	Rat 1	Rat 2	Rat 3
Jour 1	3	4	3
Jour 2	4	4	4
Jour 3	4	4	4

Les rats du lot allergie au premier jour on atteint le stade 3 et atteignent stade 4 au 2eme et 3eme jour.

Table 4 Evolution quotidienne de la réaction allergique chez les rats du lot 5

	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4
Jour 1	1	1	2	1
Jour 2	1	1	2	4
Jour 3	1	1	4	4

Table 5 Evaluation quotidienne de la réaction allergique chez les rats du lot 6

	Rat 1	Rat 2	Rat 3
Jour 1	1	1	1
Jour 2	1	1	1
Jour 3	4	4	4

REMARQUE : respiration difficile retardée après 60 min concernant le rat.

Selon le tableau on constate que :

Les rats du lot « allergie+ silla » au premier jour atteignent le stade 1, au cours du deuxième jour 50% des rats sont au Stade 1 et 25% atteignent le stade 2 et 25% atteignent le Stade 4, et au 3^{ème} jour 50% des rats atteignent le stade 1 et 50% atteignent le stade 4 Les rats du lot « allergie +pollen » :

Sont au stade 1 pour le jour 1 et 2. et ont atteint le stade 4 pour le jour 3.

3. Profil électrophorétique des protéines sériques

3.1. Albumine sérique

Le traitement avec l'extrait de *S. maritima* et de pollen des rats allergiques entraîne une augmentation de l'ordre de 1.3% des taux d'Albumine comparativement aux rats contrôle.

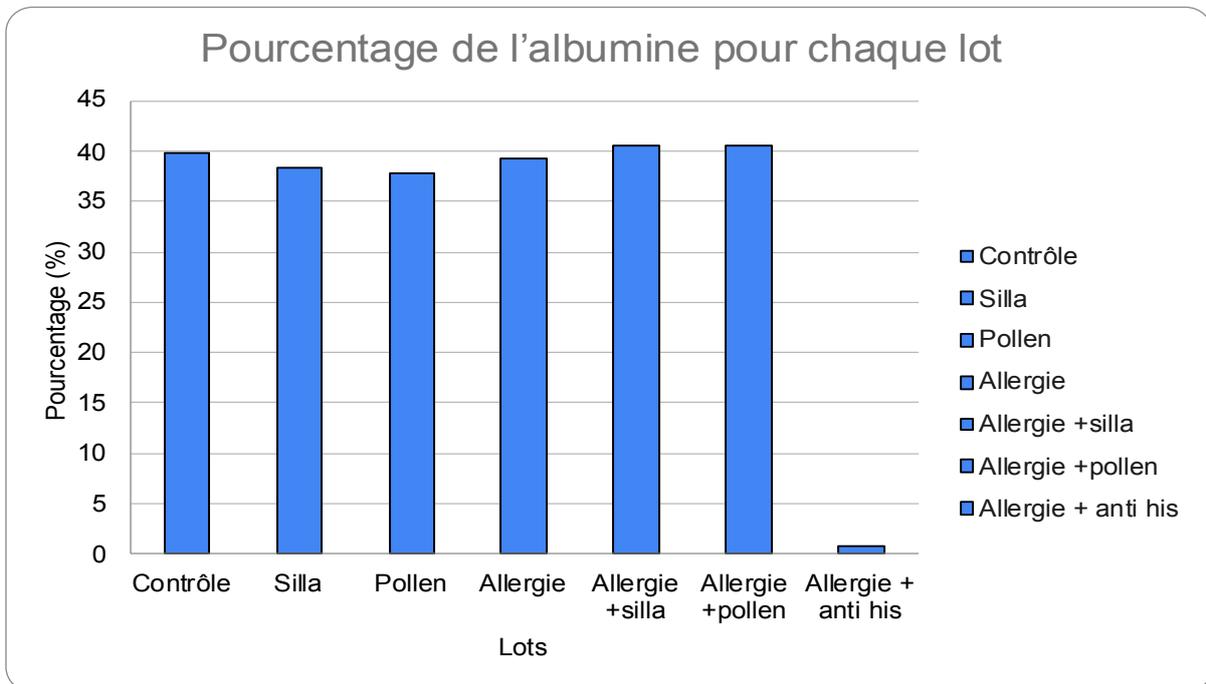


Figure 16 Effet des extraits de *S. maritima* et du pollen sur le taux d'albumine (exprimé en %)

3.2. Fraction alpha-1

Le traitement des rats avec les extraits de *S. maritima* ou du pollen entraîne une réduction des taux de la fraction alpha 1 de l'ordre de 15.8 et 16.85 pour les extraits de *S. maritima* et du pollen respectivement comparativement au rats contrôle. Cependant, le traitement des rats allergiques avec *S. maritima* entraîne une augmentation des protéines alpha 1 alors que l'extrait de pollen n'a pas d'influence sur cette fraction.

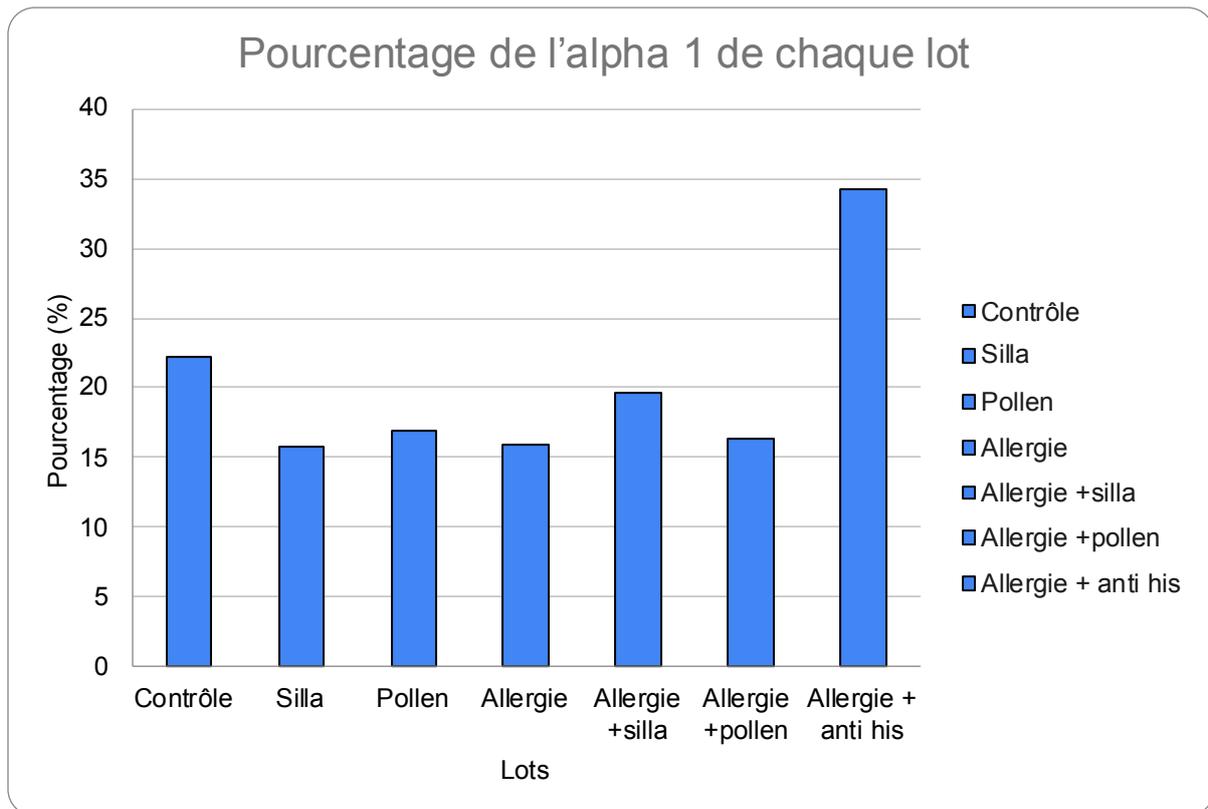


Figure 17 Effet des extraits de *S. maritima* et du pollen sur le taux Fraction alpha-1

3.3. Fraction alpha-2

Le traitement avec l'extrait de *S. maritima* entraîne une diminution de 2.3% des taux de la fraction alpha 2 comparativement au control tandis que traitement par le pollen n'as d'effet. De même, les rats allergiques présentent une réduction des protéines alpha 2 alors que les deux extraits restaurer les taux de la fraction de manière comparative au contrôle.

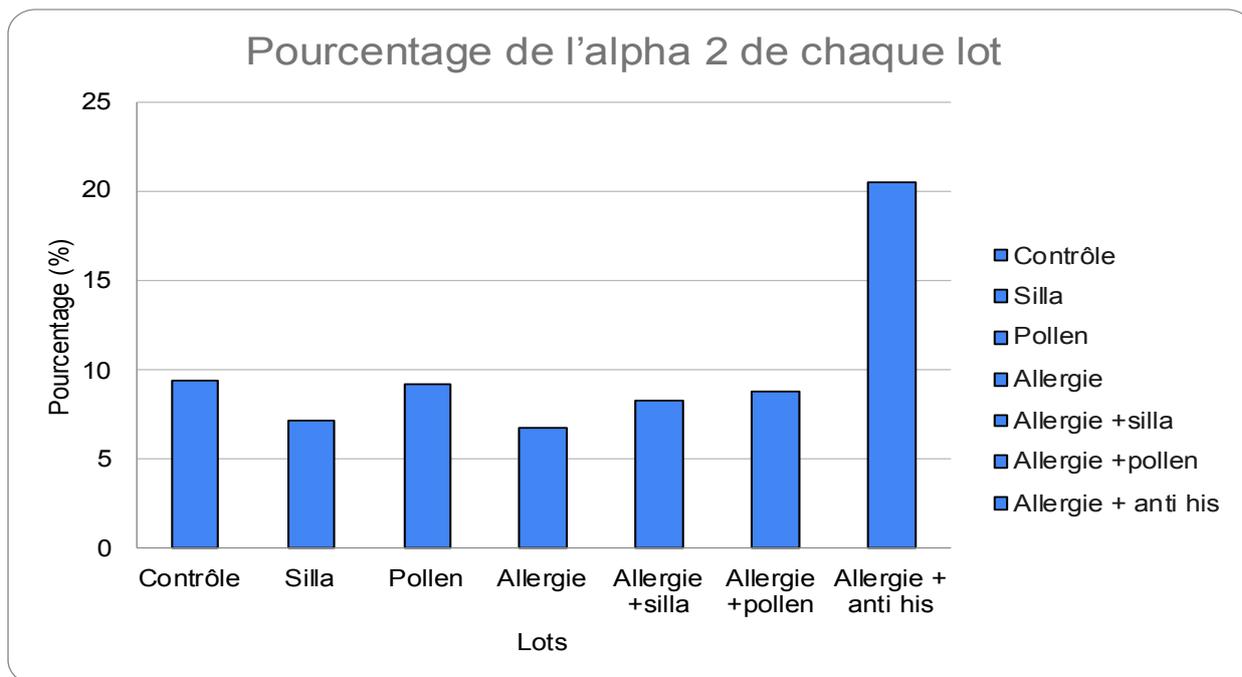


Figure 18 Effet des extraits de *S. maritima* et du pollen sur le taux Fraction alpha-2

3.4. Fraction Beta globuline

Les résultats montrent que les rats traités avec l'extrait du *S. maritima*, l'extrait du pollen ou les rats allergiques ont un taux élevé de beta globuline comparativement au contrôle.

Le traitement avec les deux extraits entraîne de réduction de cette fraction chez les rats allergiques.

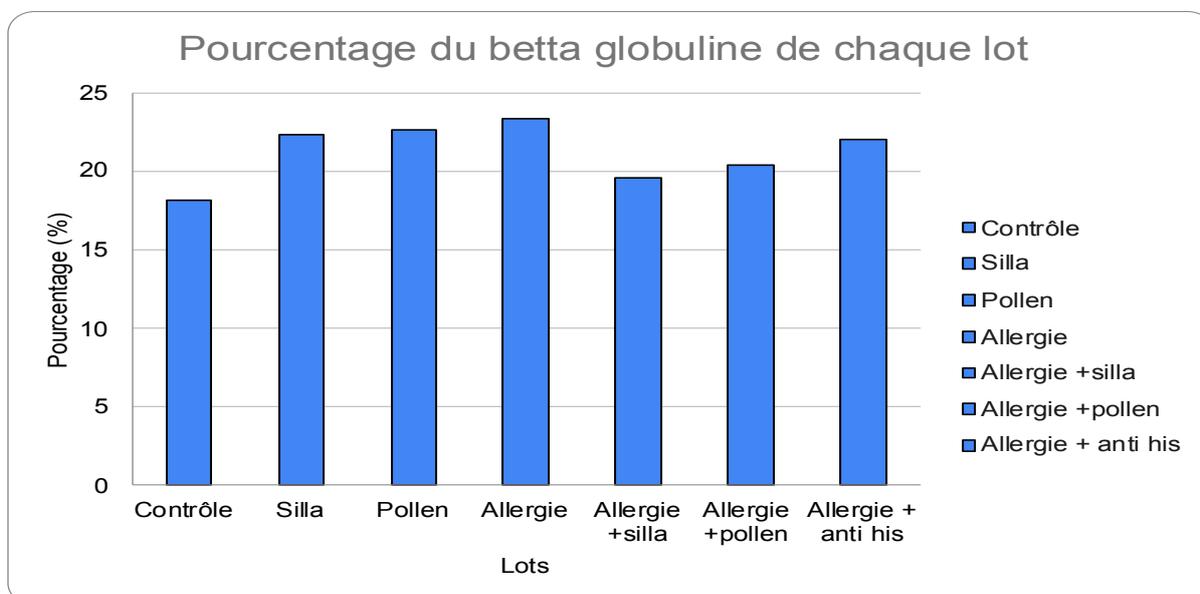


Figure 19 Effet des extraits de *S. maritima* et du pollen sur le taux Fraction beta globuline.

3.5. Fraction Gamma

On observe sur la figure 20 que le traitement avec l'extrait de *S. maritima* ou avec le pollen entraîne une augmentation des gamma globuline chez les rats sains. L'allergie entraîne une augmentation gamma globuline (14.8% comparativement au contrôle), alors que le traitement avec les deux extraits réduit ces taux. On note également que l'effet de l'extrait de *S. maritima* est plus important

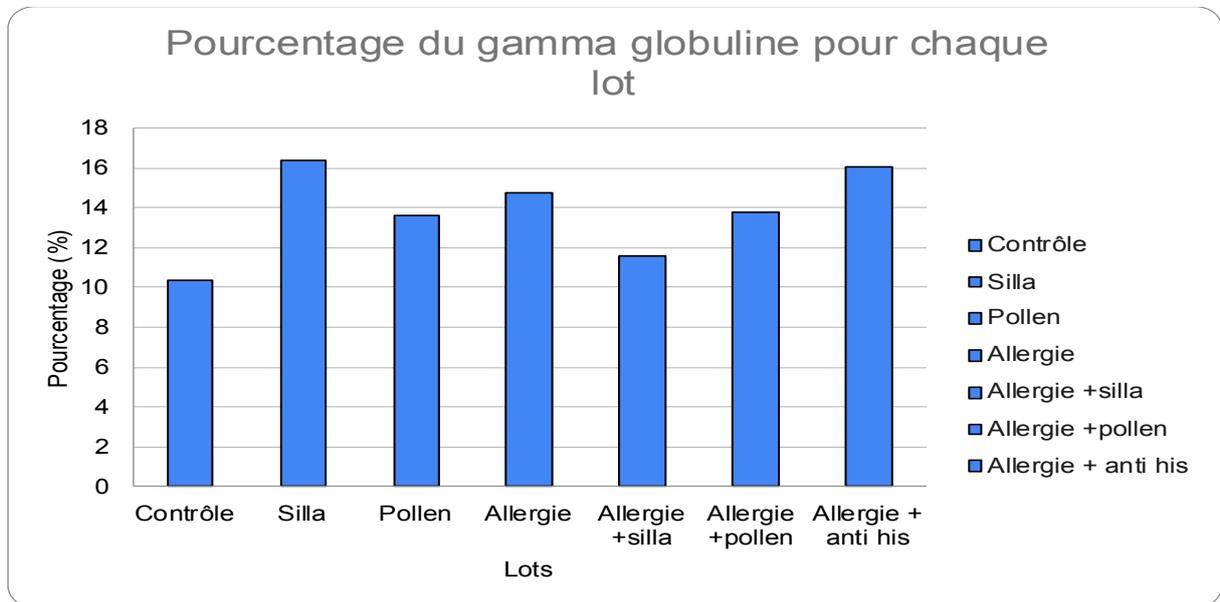


Figure 20 Effet des extraits de *S. maritima* et du pollen sur le taux fraction gamma globuline.

4. Etude de l'effet de l'extrait de *S. maritima* sur la structure pulmonaire chez les rats

4.1 Structure du tissu pulmonaire du lot contrôle

Les coupes histologiques des tissus pulmonaires chez les rats contrôlent (fig21) désignent une structure pulmonaire standard sans aucune altération structurale. La figure montre deux bronchioles, l'une terminale (BRT) et l'autre respiratoire (BRR). Ces bronchioles ont une structure préservée, Les BRT se caractérisent par une lumière très régulière. Tans dit que les BRR apparaissent comme un conduit à paroi incomplète ou de nombreux canaux y débouchent. Les alvéoles pulmonaires apparaissant comme des cavités arrondies (fig21).

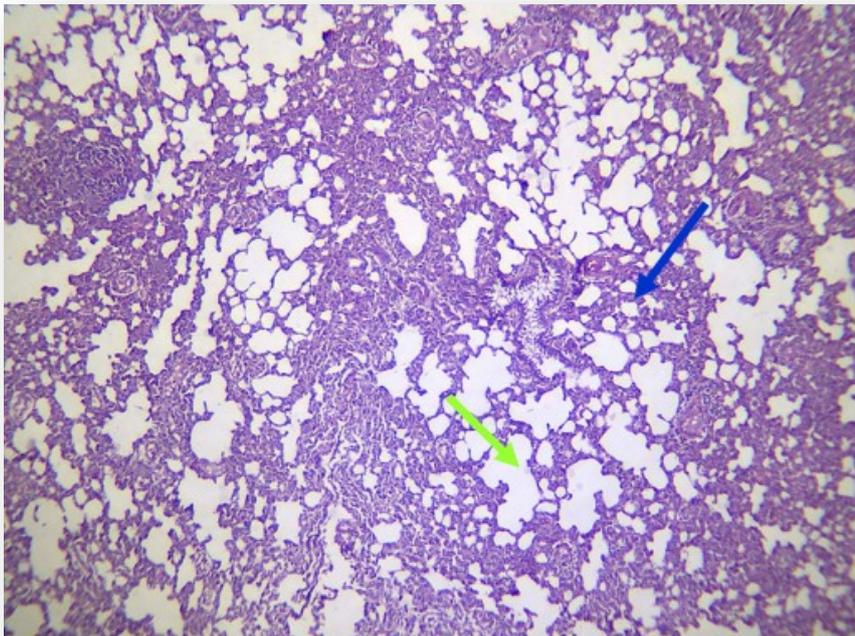


Figure 21 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot contrôle (GX40).

Flèche verte : bronchiole respiratoire, Flèche bleu : Bronchiole terminale

4.2 Structure du tissu pulmonaire du lot allergie

Les coupes histologiques des tissus pulmonaires chez les rats du lot allergie (fig. 22) désignent une structure pulmonaire caractérisée par des altérations structurales. On note sur la figure présente plusieurs bronchioles terminales BRT et des alvéoles de forme irrégulière et un parenchyme pulmonaire lésé

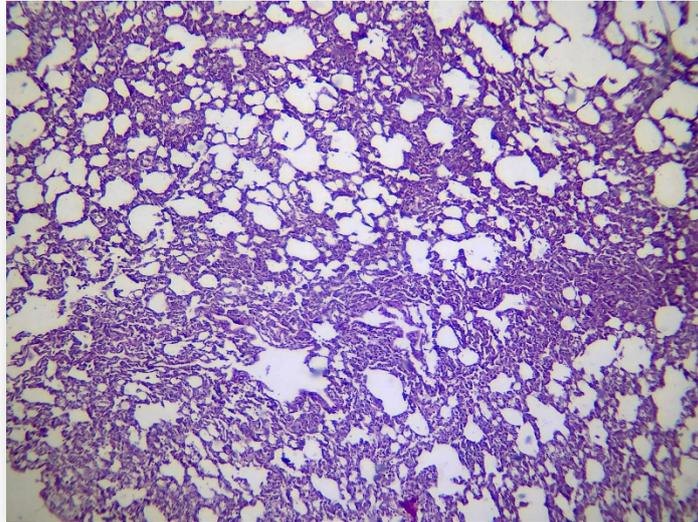


Figure 22 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot allergie (GX40).

4.3. Effet de *S. maritima* sur la structure histologique du poumon

Les coupes histologiques des tissus pulmonaires chez les rats traités avec *S. maritima* (fig.23) montrent une structure pulmonaire lésée. On observe une altération du parenchyme pulmonaire. Une fusion des alvéoles pulmonaires provoquée par la perte des tissus conjonctifs et de l'épithélium endothéliiforme qui les entoure.

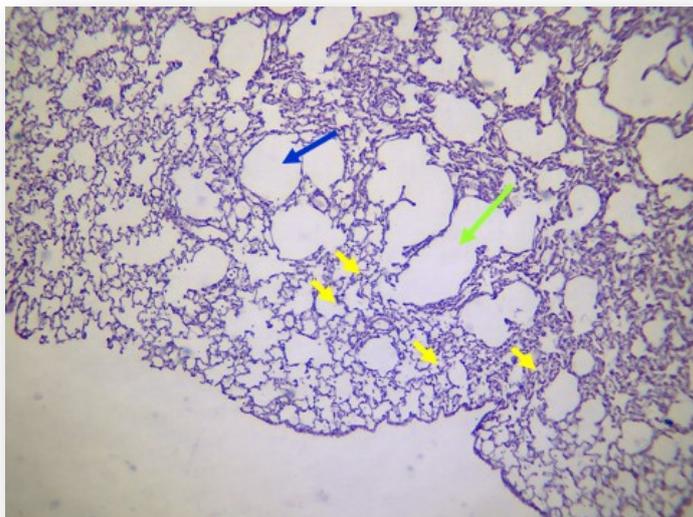


Figure 23 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot *S. maritima* (GX40)

Flèche bleu : bronchiole terminale, flèche jaune : parenchymes lysées, flèche verte : bronchiole respiratoire

4.4. Structure du tissu pulmonaire du lot pollen

Les coupes histologiques des tissus pulmonaires chez les rats du lot traité avec pollen représenté dans la figure 24 illustre des altérations structurales. On note la présence d'une bronchodilatation avec une fusion des alvéoles résultante de la perte l'intégrité des tissus conjonctifs.

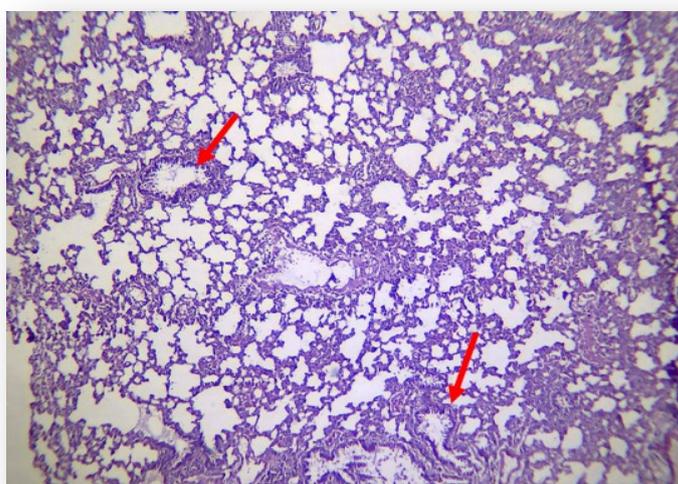
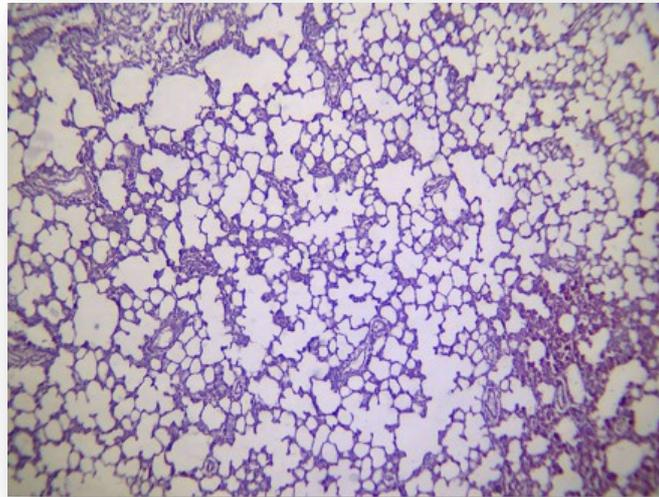


Figure 24 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot pollen GX40.

Flèche rouge : Bronchodilatation du BRT

4.5. Structure du tissu pulmonaire du lot allergie + *S. maritima*

L'analyse des coupes histologiques des rats allergiques traités avec l'extrait du *S. maritima* révèle une atténuation des atteintes liées aux réactions allergiques, le tissu pulmonaire montre une structure similaire à celle du control ce qui témoigne l'existence d'un effet protecteur du *S. maritima*.



*Figure 25 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot allergie + *S. maritima**

4.5. Structure du tissu pulmonaire du lot Allergie + pollen

Les coupes histologiques des tissus pulmonaires des rats allergiques traités avec l'extrait du pollen montrent un changement structural au niveau des BRT, les bronchioles sont plus larges présentant une forme irrégulière témoignant l'existence d'une dilatation des muscles lisses avec sécrétion de mucus dans la lumière.

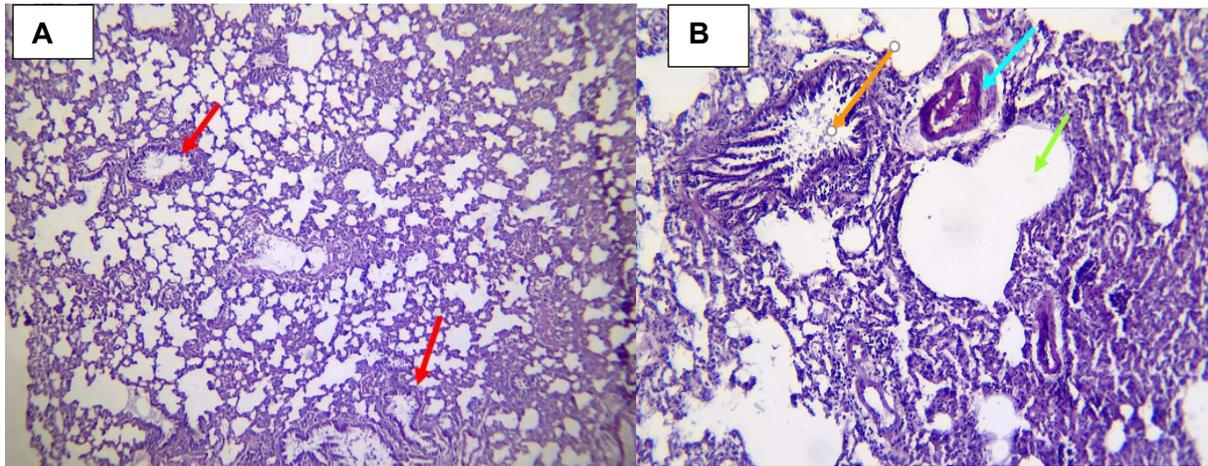


Figure 24 structure histologique du tissu pulmonaire chez les rats du lot allergie + pollen (A) : GX40, (B) : GX100

Flèche rouge : Bronchoconstriction du BRT, flèche orange : BRT dilaté avec la lumière contenant le mucus, flèche verte : Bronchiole respiratoire (BRR), flèche bleue : veine pulmonaire

Discussion

Le but de notre travail est d'évaluer l'effet thérapeutique du *S. maritima* sur l'une des formes les plus courantes des allergies respiratoires. Nous avons choisi une technique d'immunisation suivie par une sensibilisation aux protéines du pollen. Il existe plusieurs méthodes d'induction des protéines du pollen ; intrapéritonéale sublingual, sous cutanés et ainsi l'induction par voie nasale (Mitaka et al., 2011 ; Li et al., 2020).

1. Effet du *S. maritima* sur les scores allergiques

Lors de notre évaluation des scores allergiques chez les rats des lots 4 « allergie », 5 « allergie + *S. maritima* » et 6 « allergie + pollen ».

Au cours du premier jour, nous avons remarqué une forte différence entre nos deux lots (4 et 6), les rats du lot 6 (100%) ont atteint le stade 1, alors que les rats du lot 4 (66,66%) ont atteint le stade 3.

Au deuxième jour (100%) des rats du lot 6 atteignent le stade 1, alors que la totalité (100%) des rats du lot 4 atteignent le stade 4.

Au dernier jour (100%) des rats du lot 6 ont atteint le stade 4, et la totalité des rats du lot 4 atteignent le stade 4.

au cours du premier jour, nous avons remarqué une forte différence entre nos deux lots (4 et 5), les rats du lot 5 (75%) ont atteint le stade 1, alors que les rats du lot 4 (66,66%) ont atteint le stade 3.

Au deuxième jour (50%) des rats du lot 5 atteignent les stade 1, (25%) stade 2 et (25%) stade 4, alors que la totalité (100%) des rats du lot 4 atteignent le stade 4 ce qui donne une marge de (75%) entre les deux lots.

Au dernier jour (50%) des rats du lot 5 ont atteint le stade 1 et (50%) atteignent le stade 4, tandis que la totalité des rats du lot 4 atteignent le stade 4 ce qui donne une disparité de (50%) entre les deux lots.

Ces résultats prouvent que le traitement du *S. maritima* a un effet limitant l'évolution des scores allergiques et réduisant les symptômes de l'inflammation.

2. Effet du traitement aux *S. Maritima* et le pollen sur le profil électrophorétique des protéines sériques

L'analyse du profil électrophorétique montre quelques changements dans les différentes fractions de protéines sériques ; mais le traitement avec *S. maritima* à l'effet le plus marqué.

L'albumine est une protéine plasmatique, produite par le foie. Elle stabilise le volume sanguin et assure le transport des acides gras libres, des hormones et des médicaments, ces multiples capacités de liaison et sa forte concentration plasmique en font une protéine de transport et de détoxification importante pour l'organisme **(Yuwen et al., 2017)**. Nos résultats montrent que la production hépatique n'est pas affectée par les différents types de traitements.

La fraction des alpha-1-globulines comprend entre autres l'alpha-1-glycoprotéine acide et l'alpha-1-antitrypsine. L'alpha-1-glycoprotéine également appelée orosomucoïde est une protéine de phase aiguë et donc un marqueur de l'inflammation tels que la polyarthrite rhumatoïde. **(Boudjadi Salah ;2016)**

Nos résultats montrent que le profil électrophorétique de la fraction Alpha 1 a augmenté chez les rats allergique traités avec les deux types d'extraits comparativement aux rats sensibilisés par les protéines du pollen, ce qui prouve que le traitement avec *S. maritima* et le pollen ont provoqué la production hépatique de l'Alpha 1 qui protège les tissus pulmonaires des dommages provoqués par la protéase.

Les protéines de la fraction alpha-2-globulines sont impliquées dans la coagulation, l'inflammation telle que la C3 du complément, les IgA et d'autres protéines de transport de complexe immuns. Le traitement des rats allergiques avec *S. maritima* et l'extrait du pollen provoque l'augmentation du taux de l'alpha2 dans le sang.

La fraction gamma globuline est l'une des 3 principales fractions de globuline déterminé par l'électrophorèse. Les gamma globulines sont répertoriées comme ayant une fraction composée principalement d'immuno globuline G **(Niwa et al., 2019 ; Johnson., 2012)**. Nos résultats montrent également que le profil électrophorétique de la fraction gamma globuline à diminuer chez les rats allergiques traité par *S. maritima* et l'extrait du pollen par rapport aux rats sensibilisés ce qui prouve que le traitement a diminué le taux des IgG circulant dans le sang.

En comparant l'effet des extraits sur la fraction alpha 2 globuline et la fraction gamma globuline on conclue que nos extrait ont stimulé le transport et l'élimination des complexes immuns vers le foie ce qui a réduit les taux sériques de gamma globulines.

3. Effet des traitements aux extraits *S. martima* et pollen sur structures pulmonaires des rats

Les observations des coupes histologiques des rats allergiques montrent une bronchoconstriction et une fusion alvéolaire avec perte des tissus conjonctifs et des épithéliums endothéliiformes. Selon (**Wiegman et al., 2020**), les lésions alvéolaires sont dues à la libération de facteurs inflammatoires tels que l'IL-1a, IL-6, IL-8, CXCL-12, CCL2, ICAM-1, KEAP-1 et MIF, à l'activation de voies intracellulaires telles que la voie MAPK, le TLR, etc. Et enfin, à l'induction d'un stress oxydatif causé par une diminution de la réponse antioxydante et une augmentation de la production de radicaux libres.

La bronchoconstriction est une contraction anormale de la paroi lisse des voies respiratoires résultante de l'interaction complexe entre les cellules et les médiateurs proinflammatoires. Cette contraction est due à une sécrétion importante par les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles) de médiateurs inflammatoires dont l'histamine, la prostaglandine D2/ F2a, et les leucotriènes C4, D4, E4 (**Lumb et Horncastle., 2019**).

Lors de notre observation on a remarqué la présence d'une bronchodilatation au niveau d'une BRT, avec une sécrétion importante du mucus dans sa lumière chez les rats allergiques traités avec l'extrait du pollen. Ces résultats valident les travaux de plusieurs chercheurs. L'étude de **boutemine et al., 2018** a démontré que les protéines du pollen ont un effet protecteur en stimulant les cellules caliciformes responsable de la sécrétion du mucus cette sécrétion va former une couche protégeant les parois entourant les bronchioles.

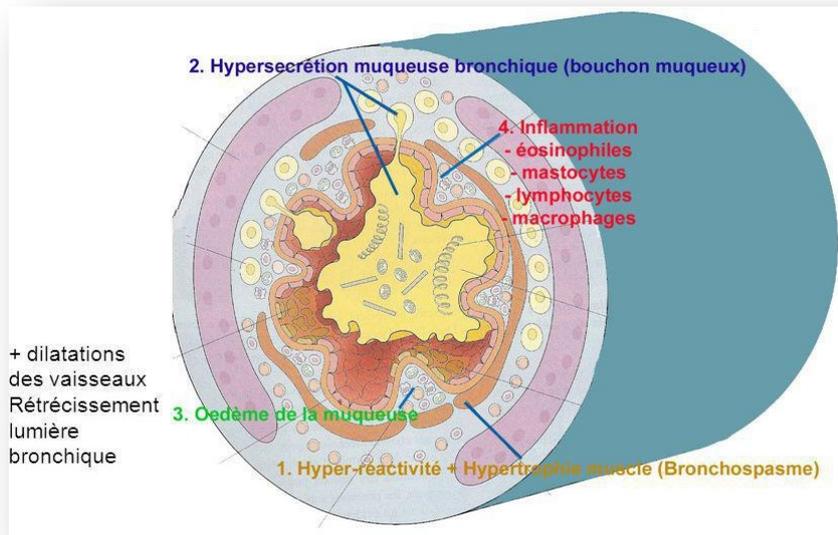


Figure 26 structure cellulaire d'une bronchiole

Les coupes histologiques des rats atteints d'une allergie respiratoire et traités par l'extrait du *S. maritima* ont montré une atténuation substantielle des lésions au niveau pulmonaire par rapport aux rats traités par l'extrait de la plante uniquement ; on remarque une diminution de la bronchoconstriction avec préservation de la structure des alvéoles pulmonaires.

L'extrait du *S. maritima* est pourvu d'une composition chimique assez complexe, il contient un grand nombre de molécules ayant un pouvoir antioxydant ce qui a été démontré dans les tests DPPH et FRAP ces molécules sont principalement des polyphénols et des flavonoïdes. Les polyphénols peuvent bloquer les réactions en chaîne des radicaux libres, agissant comme inhibiteurs d'enzymes ou agents chélateurs de métaux (El fennouni, 2009). Ils peuvent également jouer un effet bronchodilatateur (broncho relaxant) pour l'asthme et les effets modulateurs de la sécrétion de muqueuses. (Adam, 2007)

L'effet de la plante *S. maritima* sur l'asthme et les allergies respiratoires n'a pas encore été étudié néanmoins d'autres recherches ont reporté un effet diurétique par action cardiovasculaire mais aussi par action rénale directe : elle augmente le débit sanguin au niveau du rein (Chalmers et al., 1974). Elle exerce une activité anti-inflammatoire, anti-oxydante, antibactérienne, anticholinergique, antivirales et antifongiques. Ces effets sont majoritairement attribués aux polyphénols, mais certaines études ont démontré que l'activité antifongique de *S. maritima* est liée à une glycoprotéine localisée dans la paroi cellulaire de l'ampoule, qui inhibe complètement la germination des spores et la croissance des hyphes (Deepak et al., 2003).

Conclusion et Perspectives

L'asthme allergique est une maladie inflammatoire des bronches, liée à l'inhalation des allergènes qui débutent essentiellement avant l'âge de 20 ans, l'objectif de ce travail est d'étudier l'effet thérapeutique des deux extraits (*S. maritima* et pollen) sur un modèle d'asthme allergique induit par le pollen chez les rats.

Il est lié à une inflammation bronchique induite par le conflit allergène-IgE et modulée par l'hyper-réactivité bronchique non spécifique. Elle combine les mécanismes cellulaires des hypersensibilités.

Ce travail a permis d'évaluer l'effet thérapeutique du *S. maritima* sur un modèle murin atteint d'asthme allergique.

Sur la base de nos résultats nous avons montré que :

- ❖ L'extrait de *S. maritima* entraîne :
 - Scores allergiques
 - Activité antioxydante
 - Profil électrophorétique
 - Observation des coupes histologiques
- ❖ L'extrait du pollen entraîne :
 - Scores allergiques
 - Activité antioxydante
 - Profil électrophorétique
 - Observation des coupes histologiques

Sur le plan histologique, *S. maritima* a montré des propriétés anti-inflammatoires traduites par : une diminution de la bronchoconstriction (effet bronchodilatateur), baisse de la réaction inflammatoire dans le tissu pulmonaire (préservation de sa structure générale).

En conclusion l'extrait de *S. maritima* possède un effet plus puissant que celui du pollen il peut être source de molécules thérapeutiques contre l'asthme

À l'avenir il serait intéressant de compléter l'étude par des tests de l'effet de notre extrait de *S. maritima* sur l'infiltration et l'activation des mastocytes et des éosinophiles, et la production des IgE.

Evaluer l'effet de l'extrait *S. maritima* sur la production de cytokines impliquées dans l'asthme allergique tel que l'IL-4 et l'IL-13 et les cytokines inflammatoires comme le TNF alpha

Etudier l'effet de *S. maritima* sur les différentes activités biologiques in vitro et in vivo telles que l'activité antimicrobienne, antifongique, anti-inflammatoire et antitumorale ainsi que d'autres modèles d'allergies.

Références

AMOUZOU Tête YAOVI, et, MAIGA Issiaka HASSANE. Effet de l'extrait éthanolique d'un mélange de plantes sur la réaction allergique. 2014.

Costa de Araujo, P., & Battisti, O. (2010). Comment j'explore une masse cervicale chez l'enfant. *Revue Médicale de Liège*, 65.

Belarif, L., Mary, C., Jacquemont, L., Mai, H. L., Danger, R., Hervouet, J., ... & Poirier, N. (2018). IL-7 receptor blockade blunts antigen-specific memory T cell responses and chronic inflammation in primates. *Nature communications*, 9(1), 1-13.

Boumaza, A., Mezouar, S., Bardou, M., Raoult, D., Mège, J. L., & Desnues, B. (2021). Submitted *Frontiers in Immunology*. *Étude physiopathologique des infections à Tropheryma whipplei*, 79.

CHATEAUX, Véronique. *Perception de l'asthme par les enfants et leurs parents: impact sur la qualité de vie et d'adhérence d'enfants asthmatiques*. 2005. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine-Metz.

Demoly, P., Adkinson, N. F., Brockow, K., Castells, M., Chiriac, A. M., Greenberger, P. A., ... & Thong, B. H. (2014). International Consensus on drug allergy. *Allergy*, 69(4), 420-437.

Fadlou-Allah M. (2007). Les allergies et leurs traitements. Thèse de doctorat en pharmacie N 11. Faculté de Médecine et de pharmacie de Rabat.

Gérald A., (2011). *Profil des nourrissons atteints d'allergie aux protéines de lait de vache : Etude rétrospective cas.Témoins à l'hôpital Jean Verdier (Boudy.93)*. Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en médecine. Université Denis Diderot Faculté de médecine. Paris VII. 139 pages.

Entringer, S., Buss, C., Kumsta, R., Hellhammer, D. H., Wadhwa, P. D., & Wüst, S. (2009). Prenatal psychosocial stress exposure is associated with subsequent working memory performance in young women. *Behavioral Neuroscience*, 123(4), 886–893. <https://doi.org/10.1037/a0016265>

MONDOULET, Lucie. *Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide : caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs*. 2005. Thèse de doctorat. Toulouse, INSA.

Grini Chahrazed et Saddek Nesrin. (2008). L'asthme Allergique: Etude bibliographique. Université 08 Mai 45. Guelma. 44 pages.

Krifi, M. N. (2018). *Naissance et essor de l'immunologie : Une science en devenir*. ISTE Group.

Le Clainche, T. (2020). *Optimisation de microporteurs pour l'amplification de cellules souches mésenchymateuses et étude des propriétés ostéogéniques de nouveaux biomatériaux bactéricides* (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes [2020-...]).

AMINA, Mekhalfia, KHAWLA, BENHAROUN, et AFA, MELLOULI. Rôle des chimiokines dans l'évolution de l'allergie alimentaire en asthme. 2020.

Morin, E. (2012). Pour une crisologie. *Communications*, (2), 135-152.

Parham, P. (2003). Innate immunity: the unsung heroes. *Nature*, 423(6935), 20-20.

Sanchez, M. (2015). *Évolution de l'asthme au long cours: aspects méthodologiques et lien avec la pollution atmosphérique* (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).

Sellat Y. (2015). Contribution à l'étude des allergies alimentaires à travers l'analyse de la littérature récente. Thèse de Doctorat en pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Rabat. 178 pages.

Wao. (2013). (World Allergy Organization). White book on allergy update enligne. Disponible sur <http://www.worldallergy.org/education-andprograms/education/allergicdisease-resource-center/professionals/food-allergy>

Youcef, T., & Zeggane, T. (2016). *Asthme et facteurs de risque: état des lieux* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

Annexes

LPS

Le lipopolysaccharide (ou LPS) est un composant essentiel de la paroi bactérienne des

Bactéries à Gram négatif. Sur le plan immunologique, le lipopolysaccharide constitue l'antigène O des bactéries à Gram négatif. Le LPS est un lipide complexe auquel est attaché un polysaccharide qui est responsable de la spécificité antigénique de l'antigène O. Sur le plan physiopathologique, le LPS, extrêmement toxique, représente l'endotoxine des bactéries à Gram négatif.

Cytokines :

Les cytokines (du grec cyto, cellule, et kinos, mouvement) sont un ensemble hétérogène de protéines ou de glycoprotéines solubles (masse moléculaire moyenne de 8 à 50 kDa). Elles jouent le rôle de signaux permettant aux cellules d'agir à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. À la différence des hormones dont le taux de sécrétion est continu bien que modifié par des signaux physiologiques, les cytokines sont synthétisées principalement en réponse à un signal activateur. Chaque cytokine peut être produite par de nombreux types de cellules. Les cytokines agissent sur des cellules cibles en se fixant sur des récepteurs spécifiques de haute affinité. La liaison d'une cytokine à son récepteur induit un ensemble de signaux d'activation, de prolifération, de différenciation ou de mort cellulaire. La plupart des cytokines entraînent des réactions en cascade en induisant la production d'une autre cytokine par leurs cellules-cibles. Leurs effets sont très souvent redondants : l'induction d'une même réponse cellulaire peut être obtenue avec différentes cytokines se fixant chacune sur son récepteur spécifique.

Lymphocytes :

Les lymphocytes sont des cellules qui ont un rôle majeur dans le système immunitaire. En matière de structure et de fonction, on distingue trois lignées lymphocytaires différentes : les lymphocytes B et T, de petite taille, et les lymphocytes NK, de grande taille et granuleux. Les lymphocytes sont des leucocytes (globules blancs) de petite taille se trouvant principalement dans les ganglions lymphatiques et la rate.

Anticorps :

Un anticorps est une protéine du sérum sanguin sécrétée par les lymphocytes B (globules blancs intervenant dans l'immunité) en réaction à l'introduction d'une substance étrangère (antigène) dans l'organisme.

Complexe immun :

Un complexe immun est le résultat d'une interaction moléculaire entre un anticorps et un antigène ; L'anticorps possède une affinité spécifique pour un épitope particulier de l'antigène. Celui-ci est reconnu par le paratope de l'anticorps, qui correspond à la partie appelée variable. Le complexe immun est un processus de l'immunité innée qui a pour rôle de protéger l'organisme contre les molécules du non-soi (bactéries, virus). L'interaction anticorps-antigène peut provoquer ; soit l'activation du complément qui va détruire l'antigène ou la phagocytose du complexe immun, et sa digestion.

Radicaux libres :

Les radicaux libres sont molécules instables d'oxygène qui prennent les électrons d'autres molécules pour s'auto-stabiliser. Une réaction en chaîne est alors provoquée, conduisant au vieillissement de la peau. Ils sont fabriqués en excès par les cellules sous l'effet de différents stress.

Antioxydant :

Un antioxydant (AOX) est une molécule qui ralentit ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques à leur contact. L'oxydation fait partie d'une réaction oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : ATTEF Mafez
BELAGRA Mohamed Malik
BOUYOUCEF Djamil Allaoua

Evaluation de l'effet thérapeutique du *Scilla Maritima* Chez des rats atteints d'une allergie respiratoire

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Immunologie moléculaire et cellulaire

Une allergie est une réaction excessive des bronches à l'intrusion dans l'organisme d'un composant normalement inoffensif de l'environnement appelé allergène. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des bronches qui se manifeste par des accès de gêne respiratoire. Dans le cas de l'asthme allergique, c'est un allergène qui déclenche la crise d'asthme. L'asthme allergique se présente sous forme d'asthme persistant léger, asthme persistant modéré ou asthme persistant sévère en fonction de plusieurs facteurs qui sont : facteurs endogènes et facteurs exogènes. L'objectif de ce travail est de tester l'effet thérapeutique du *S. maritima* et pollen sur l'asthme allergique. L'étude a été réalisée sur des rats Wistar après induction d'asthme allergique au pollen. Nos résultats ont montré que l'extrait du *S. maritima* réduit les scores allergiques chez ces rats ; il affecte le profil électrophorétique des protéines sériques en augmentant les fractions alpha 1 et alpha 2 sur le plan tissulaire l'extrait possède un effet protecteur contre les altérations pulmonaires induites par l'asthme comme la bronchoconstriction et la perte de la structure alvéolaire, cet effet est lié à l'activité antioxydante et anti-inflammatoire.

Mots-clefs : *S. maritima*, Pollen, Asthme Allergique, Allergène.

Laboratoires de recherche : Laboratoire de Centre de recherche des sciences pharmaceutiques (CRSP)

Encadreur : EL OUAR Ibtissem (Prof - Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examineur 1 : NOM Prénom (Grade - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : NOM Prénom (Grade - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

