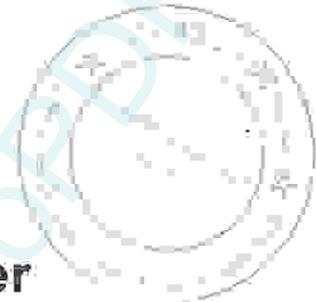


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

UNIVERSITE 8 MAI 1945 - GUELMA -
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



AR/553

SAO 257

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire : Immunologie approfondie

Thème

**Les effets des alcaloïdes extraits du Khat (*Catha edulis* Forsk.)
sur le système immunitaire**

Présenté par :

DJEBBAR Warda

DJENAOUI Selma

Devant le jury composé de :

Président : M. Hemicci Ahmed M. A. A

Promotrice : M^{me} BENDJEDDOU Dalila Pr.

Examinatrice : M^{me} KAIDI Souaad M. A. B

Examinatrice : M^{me} BOUKAMARA Hanane M. A. A

Juin 2012

Remerciements

En premier lieu, nous remercions Dieu tout puissant qui nous a donné la force de mener à terme ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profond attachement, notre gratitude et notre sincère reconnaissance à Madame **D. Bendjeddou**, Professeur à l'université de Guelma, encadreur de notre mémoire de Master II, de nous avoir donné l'opportunité de former en immunologie, pour ses conseils et discussions scientifiques, sa compétence et sa grande patience qui ont permis de mener à bon terme ce travail.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Monsieur **A. Hemici**, Maître assistant A, à l'université de Guelma, qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

Nos chaleureux remerciements vont également à Madame **S. Kaïdi**, Maître assistante B et Madame **H. Boukamara**, Maître assistante A, à l'université de Guelma, pour nous avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Bien que le mémoire soit fondamentalement un travail binomial, il n'aurait pu être mené à bien sans une équipe de collègues qui contribuent au bon fonctionnement du laboratoire, avec lesquels il est possible d'échanger conseils et suggestions, et qui assurent une atmosphère de travail donnant envie de se lever chaque matin. Nous remercions pour cela tous mes collègues d'immunologie et tous les membres du laboratoire d'immunologie et biochimie de Guelma, nous citons en particulier Manel, Basma, Leïla, Samah, Imer et Asâad.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à **S. Djenaoui**, enseignante de Maths à l'université de Guelma, pour son aide précieuse.

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.

Dédicace

♥ A mes chers parents *Boulef* et *Houreddine*, qui m'ont aidé à être ce que je suis, avec tant d'amour et d'affection.

♥ A mes chers frères : *Mohamed*, *Abd-essalem* et *Ahmed*, et sœurs : *Estiha*, *Meriem* et *Nabila*, pour leur aide et leur soutien moral.

♥ A mes plus chères amies : *Warda* et *Eshra*.

♥ A toute ma famille et à tous ceux qui ont contribué un jour à mon éducation.

Je dédie ce modeste travail.

Selma

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes très chers parents *Hada* et *Balgacem* pour leurs dévouements, leur amour, leur sacrifice et leurs encouragements. Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.

A mes chers frères : *Taher* et son épouse *Nadjate*, *Rabi3* et son épouse *Ismahane*, *Hamid*, *Zin-eddine*, *Youcef* et *Houcine* pour leurs soutiens moraux, et matériels et sans oublier ma petite nièce « *Assinate* » que

Dieu la garde.

À ma chérie *Selma* pour sa présence à mon côté et son soutien.

A mes deux amies de chambre : *Meriem* et *fatima zohra* que je les considère comme sœurs.

A mes amies : *Souhila* , *Hoda* , *Nora*, *Sabrina*, *Samia*, *Karima*,
Manel, *fayza* , *Hayate* et *Ndajate*.

À toute ma famille qui n'ont pas cessé de m'encourager.

À tous ceux qui m'aime et qui j'aime.

warda

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ACC	Cytotoxicité médiée par le complément dépendante des anticorps
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
BCR	B cell receptor
CD	Cellule dendritique
CFA	Adjuvant complet de Freund
CGMSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocyte-macrophage
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CMP	Progéniteur myéloïde commun
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de type I
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CR	Récepteurs aux compléments
DNP₂₄-BSA	Albumine dinitrophénylée du sérum de boeuf
EAs	Alcaloïdes de l'ergot de seigle
EDTA	Acide Ethylène Diamino Tétracétique
FNS	Formule numérique sanguine
Fig	Figure
HIV	Virus humain d'immunodéficience
HLA	Human leucocyte antigen
Ig	Immunoglobuline
IL-1	(-6 etc) Interleukine-, interleukine-6, etc
IFN-γ	Interféron- γ
LB	Lymphocyte B
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MAPKs	Mitogen-activated protein kinase.
MCP-1	Protéine-1 chimiotactique des monocytes
NFAT	Facteur nucléaire des cellules T activées

NF-κB	Facteur nucléaire κ B (facteur de transcription)
NK	Cellules tueuses naturelles (Natural Killer)
NO	Oxyde nitrique
PDB	Phorbol dibutyrate
PHA	Phytohémagglutinine
PKC	Protéine kinase C
pKa	Constante de dissociation apparente
PMA	Acétate de myristate de phorbol
POA	Alcaloïdes d'oxindoles pentacycliques
PRR	Récepteurs reconnaissant des motifs
RA	Arthrite rhumatoïde
rpm	Round par minute
SE	Système endocrinien
SGA	Syndrome Général d'Adaptation
SI	Système immunitaire
SNC	Système Nerveux Central
T	Témoin
Tab	Tableau
TCR	T cell receptor
T CD4 ou T4	Lymphocyte T porteur du marqueur membranaire CD4 (T auxiliaire)
T CD8 ou T8	Lymphocyte T porteur du marqueur membranaire CD8 (T cytotoxique)
TLR 4	Toll-like receptor 4
Th	Lymphocyte T auxiliaires ou T helper
Th1 / Th2	Lymphocyte T auxiliaires de type 1 ou 2, produisant des cytokines de type 1 (IL-2, TNF, IFN- γ) ou de type 2 (IL-4, IL-6, IL-10)
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale α (tumor necrosis factor α)
UICPA	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée.

Liste des figures

Figure	Titre	page
1	Structure chimique de : (a) Solanine, (b) Nicotine	5
2	Structure chimique de la morphine	5
3	Quelques alcaloïdes isolés par Pelletier et Caventou (1817-1821)	6
4	Structures chimiques de quelques alcaloïdes toxiques	6
5	Structure chimique de : (a) Rétronécine, (b) Cocaïne	9
6	Structure chimique de : (a) Lobéline, (b) Sparteine et (c) Castanospermine	9
7	Structure chimique de : (a) Éphédrine, (b) Berbérine	10
8	Structure chimique de : (a) La vinblastine, (b) quinine, (c) Camptothécine, (d) Ergotamine	10
9	structure chimique de : (a) Fébrifugine, (b) Acronycine	11
10	Structure chimique de : (a) Nicotine, (b) Anabasine	11
11	Structure chimique de Pilocarpine	12
12	Structure chimique de : (a) Solasodine, (b) Bufaline	12
13	Principales plantes médicinales à alcaloïdes	15
14	Structure du CMH I et II et les gènes qu'ils codent	18
15	Cellules immunitaires de la lignée monocytaire	19
16	Cellules immunitaires de la lignée granulocytaire	20
17	Mastocytes	21
18	Récepteur des cellules T (TCR)	21

19	Récepteur des cellules B (BCR) et plasmocytes	22
20	Cellules NK	22
21	Organes primaires et secondaires	23
22	Organisation structurale des immunoglobulines	29
23	Partie de la plante du khat	45
24	Matériel biologique	46
25	Schéma représentatif du protocole expérimental	47
26	Le péritoine de la souris	48
27	Injection de PBS dans la cavité péritonéale	49
28	La dilacération de la rate	50
29	La dilacération du thymus	51
30	Variation du poids de la rate et du thymus entre témoins et traitées.	53
31	Variation du nombre des splénocytes et thymocytes entre témoins et traitées.	54
32	Variation du nombre des macrophages péritonéaux entre témoins et traitées	55
33	Variation du nombre des globules blancs entre les témoins et traitées	56
34	Variation du nombre des lymphocytes entre les témoins et traitées	56
35	Variation du nombre des monocytes entre les témoins et traitées	57
36	Variation du nombre des granulocytes entre témoins et traitées	58

Liste des tableaux

Tableau	Titre	page
1	Quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé	8

Produced with ScanTOPDF

Table des matières

Introduction générale.....	1
1. Synthèse bibliographique.....	3
1. Alcaloïdes et types de métabolites secondaires.....	4
1.1. Métabolites secondaires.....	4
1.2. Définition du terme alcaloïde.....	4
1.3. Structure et Classification des alcaloïdes.....	7
1.3.1. Alcaloïdes dérivés de l'ornithine.....	9
1.3.2. Alcaloïdes dérivés de la lysine.....	9
1.3.3. Alcaloïdes dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine.....	10
1.3.4. Alcaloïdes dérivés du tryptophane.....	10
1.3.5. Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique.....	11
1.3.6. Alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique.....	11
1.3.7. Alcaloïdes dérivés de l'histidine.....	12
1.3.8. Alcaloïdes produits à partir de réactions d'amination.....	12
1.4. Nomenclature des alcaloïdes.....	13
1.5. Propriétés physico-chimiques et biologiques des alcaloïdes.....	13
1.5.1. Propriétés physico-chimiques.....	13
1.5.2. Propriétés biologiques.....	14
1.6. Alcaloïdes et plantes médicinales.....	14
2. Généralités sur le système immunitaire.....	17
2.1. Notions du "soi" et du "non-soi".....	17
2.2. Composants du système immunitaire.....	18
2.2.1. Cellules de la lignée myéloïde et de la lignée lymphoïde.....	18
2.2.2. Organes primaires et secondaires.....	22
2.3. Immunité innée (ou non spécifique).....	23
2.3.1. Facteurs mécaniques, chimiques et physiologiques.....	24
2.3.2. Facteurs cellulaires.....	25
2.3.3. Système du complément.....	26
2.3.4. Réaction inflammatoire.....	26
2.4. Immunité adaptative (ou spécifique).....	28
2.4.1. Immunité humorale et production des anticorps.....	28
2.4.2. Immunité à médiation cellulaire.....	30
2.5. Notion d'immunostimulation et d'immunogénicité.....	30
2.5.1. Immunostimulation – Immunomodulation.....	30
2.5.2. Immunogénicité – Antigénicité.....	31

3. Propriétés immunologiques des alcaloïdes	33
3.1. Effet anti-microbien	33
3.1.1. Effet anti-viral	33
3.1.2. Effet anti-bactérien	34
3.1.3. Effet anti-fongique.....	34
3.1.4. Effet anti-parasitaire	34
3.2. Effet anti-inflammatoire.....	35
3.3. Effet anti-tumoral	36
3.4. Effet immunostimulant et effet immunosuppresseur.....	37
3.4.1. Effet sur les lymphocytes T.....	37
3.4.2. Effet sur les lymphocytes B.....	39
3.4.3. Effet sur les cellules NK.....	39
3.4.4. Effet sur les macrophages.....	39
3.4.5. Effet sur les cellules dendritiques.....	40
3.4.6. Effet sur les monocytes	41
3.4.7. Effet sur les mastocytes	41
3.4.8. Effet sur les neutrophiles	42
3.4.9. Effet sur les basophiles.....	42
3.4.10. Effet sur les éosinophiles.....	43
II. Étude expérimentale	44
1. Matériel et Méthodes	45
1.1. Matériel	45
1.1.1. Matériel végétal et phytochimique.....	45
1.1.2. Matériel biologique (modèle animal).....	46
1.1.3. Conditions d'élevage.....	46
1.2. Méthodes	47
1.2.1. Protocole expérimentale.....	47
1.2.2. Traitement	47
1.2.3. Prélèvement sanguin	48
1.2.4. Isolement des macrophages péritonéaux.....	48
1.2.5. Prélèvement des organes.....	50
1.2.6. Isolement des splénocytes	50
1.2.7. Isolement des thymocytes	51
2. Résultats et Discussions	53
2.1. Variation du poids du thymus et de la rate.....	53
2.2. Variation du nombre des splénocytes et thymocytes.....	53
2.3. Variation du nombre des macrophages péritonéaux.....	54
2.4. Effet des alcaloïdes du khat sur la formule leucocytaire.....	55
2.4.1. Variation du nombre des globules blancs, des lymphocytes et des monocytes	55
2.4.2. Variation du nombre des granulocytes.....	58

3. Conclusion et perspectives.....60

Références bibliographiques.....61

Résumé

Abstract

ملخص

Annexe

Produced with ScanTOPDF

Introduction générale

Le système immunitaire est un élément essentiel à notre survie et notre meilleur système de défense contre la maladie : il chasse les virus, lutte contre les bactéries, attaque les champignons, tue les parasites ainsi que les cellules tumorales.

Pour lutter contre ces agressions, l'organisme dispose de plusieurs mécanismes de protection lui permettant de reconnaître et de tolérer ce qui lui appartient (le soi), de reconnaître et de rejeter ce qui lui est étranger ou celui qui l'est devenu.

Pour cela, notre système immunitaire est constitué d'un ensemble de cellules, macrophages et granulocytes, acteurs de la réponse innée permettant une réponse rapide et parfois efficace. Si cette réponse ne l'est pas, l'immunité spécifique entre en action et entraîne la destruction des germes.

Cependant, cette immunité peut être affaiblie par plusieurs agressions, à cet effet, les alcaloïdes considérés comme des immunostimulants, peuvent être utilisés pour améliorer cette immunité et la rendre plus efficace. Ce sont des molécules très intéressantes du point de vue biologique car certaines forment le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicaments, comme poisons ou encore comme psychotropes.

Le terme alcaloïde comprend maintenant toutes les molécules naturelles alcalines extraites de plantes dont la structure contient au moins un atome d'azote.

Ces molécules magiques font partie d'un groupe distinct de métabolites secondaires. Vu leurs propriétés pharmacologiques variées, plus particulièrement immunologiques, anti-tumorale, anti-inflammatoire, antimicrobienne, ils constituent un large champ de recherches et d'investigations.

Afin d'améliorer notre connaissance de ces effets, nous nous sommes intéressées à l'étude de l'effet des alcaloïdes extrait du khai (*Catha edulis* Forsk.) sur le système immunitaire en essayant de comparer nos résultats avec ceux des études antérieures.

Ce mémoire est divisé en deux parties:

La première partie, se rapportera sur une synthèse bibliographique consacrée :

- à définir les alcaloïdes en tant que types de métabolites secondaires.
- à décrire le système immunitaire, ses composants et son fonctionnement.
- à donner quelques effets des alcaloïdes sur le système immunitaire.

La deuxième partie, se rapportera sur une étude expérimentale décrivant le matériel utilisé, les méthodes suivies, discussion des résultats obtenus et enfin cette partie est terminée par une conclusion et des perspectives.

Première partie
Synthèse bibliographique

1. Alcaloïdes en tant que types de Métabolites Secondaires

1.1. Métabolites secondaires

Les organismes vivants sont composés de métabolites issus de leur métabolisme. Il existe deux types de métabolites, les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre grandes catégories : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies et sont d'une variété structurale extraordinaire mais ils sont produits en faibles quantités. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et des composés azotés appelés alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires ; ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques (Donatien, 2009).

1.2. Définition du terme alcaloïde

Le terme alcaloïde, d'*alkali-like* (alcali d'origine arabe qui signifie base), a été introduit par Meisner au début du XIXème, en raison de leur caractère alcalin. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910 (Donatien, 2009).

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faibles doses (Donatien, 2009).

Quelques structures sont relativement simples comme la Nicotine (*Nicotiana tabacum*), tandis que d'autres sont tout à fait complexes comme la Solanine (*Solanum tuberosum*) (Fig.1).

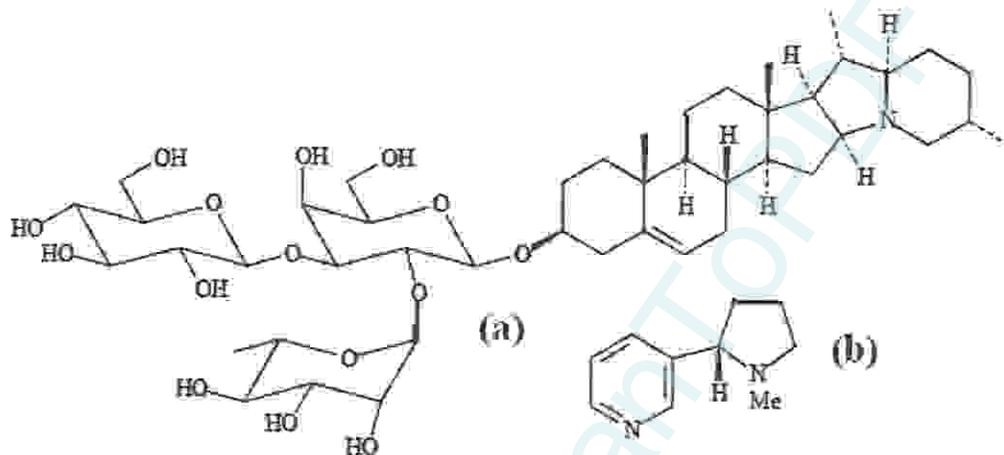
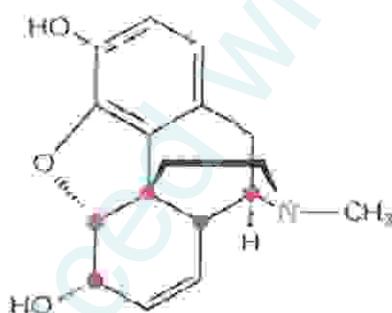


Fig.1 : Structures chimiques de : (a) Solanine, (b) Nicotine (Mauro, 2006).

Depuis l'identification du premier alcaloïde - à savoir la morphine - (Fig.2) à partir de l'opium en 1806, plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes (Mauro, 2006).



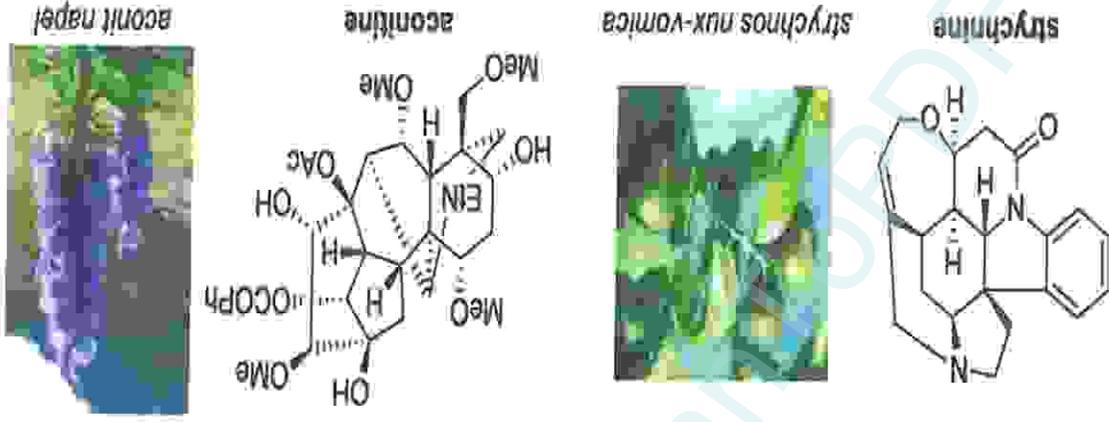
papaver somniferum

Fig.2 : Structure chimique de la morphine (Danoun, 2010).

Les alcaloïdes sont essentiellement extraits des plantes, mais on les trouve également chez quelques animaux comme les fourmis et les grenouilles (Mauro, 2006).

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits (Mauro, 2006). Ci-dessous quelques molécules d'alcaloïdes isolés à partir des plantes (Fig.3) :

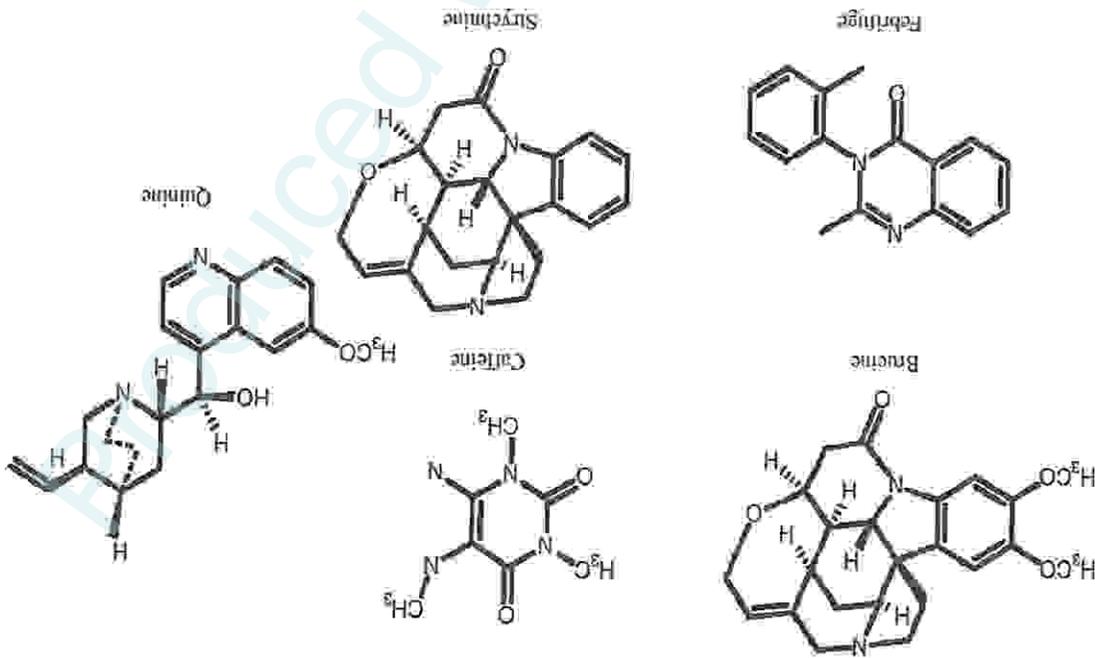
Fig.4 : Structures chimiques de quelques alcaloïdes toxiques (Danoum, 2010).



Parmi ces alcaloïdes on trouve : la strychnine, l'aconitine... (Fig.4). Plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes (Mawo, 2006).

(Amiszewski, 2007).

Fig.3 : Quelques alcaloïdes isolés par Pelletier et Caventou (1817-1821)



1.3. Structure et Classification des alcaloïdes

On estime qu'il y a plus de 10 000 alcaloïdes différents déjà isolés (ou détectés) à partir de sources différentes.

Proposer une classification pour les alcaloïdes est une tâche difficile, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale (Mauro, 2006). Plusieurs types de classifications d'alcaloïdes ont été proposées jusqu'à ce jour :

- Selon leur provenance, de l'animal, de la plante ou de l'espèce fongique duquel ils étaient originaires. Néanmoins cette classification reste difficile et longue à entreprendre (Bouclé, 2010).

- Selon leurs structures chimiques (ils sont divisés en groupes : Mescaline, Pyrrole, Pyrrolidine, Pyrrolizidine, Pyridine, Piperidine, Tropane, Quinoline, Isoquinoline, Indole, Indolizidine, Quinolizidine, Purine, Imidazole).

- Selon leurs voies biosynthétiques, ils peuvent être divisés en trois types :

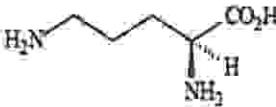
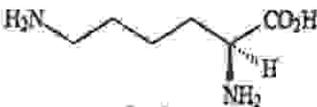
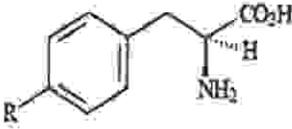
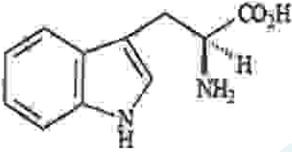
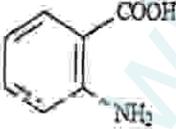
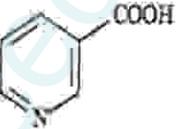
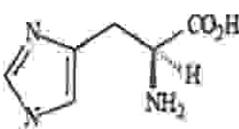
⇒ Alcaloïdes vrais (dérivent d'acides aminés et l'atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique).

⇒ Proto-alcaloïdes (dérivent d'acides aminés mais l'atome d'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle).

⇒ Pseudo-alcaloïdes (ne sont pas dérivés d'acides aminés, ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés. Ils peuvent aussi résulter d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones) (Aniszewski, 2007).

Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique, même s'il existe un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur (Tab.1) (Mauro, 2006).

Tab.1 : Quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé (Mauro, 2006).

Acide aminé	Type d'alcaloïde
 <p>Ornithine</p>	Pyrrrolidines, pyrrolizidines, tropanes
 <p>Lysine</p>	Pipéridines, quinolizidines, indolizidines
 <p>R = H, Phénylalanine R = OH, Tyrosine</p>	Alcaloïdes du type éphédrine, isoquinolénes
 <p>Tryptophane</p>	Indoles
 <p>Acide anthranilique</p>	Quinolénes, quinazolines, acridines
 <p>Acide nicotinique</p>	Pyridines
 <p>Histidine</p>	Imidazoles
Via aminations	Alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens

1.3.1. Alcaloïdes dérivés de l'ornithine

Dans ce groupe, les pyrrolizidines (la rétronécine isolée de *Senecio jacobaea* et la senécionine isolée de *Heliotropium*) et les tropanes (La cocaïne isolée de *Erythroxylum coca*, Atropine de *Atropa belladonna* et *Hyoscyamine* de *Hyoscyamus niger*) sont les plus importants (Fig.5).

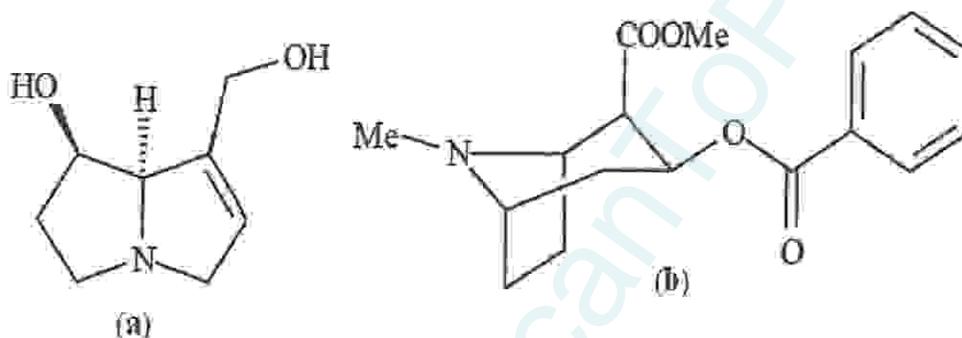


Fig.5: Structure chimique de : (a) Rétronécine, (b) Cocaïne (Mauro, 2006).

1.3.2. Alcaloïdes dérivés de la lysine

Dans ce groupe nous trouvons les composés pipéridiniques (lobéline isolée de *Lobelia inflata*), quinolizidiniques (Sparteine isolée de *Cytisus scoparius*) et indolizidiniques (Castanospermine isolée de *Castanospermum australe*) (Fig.6).

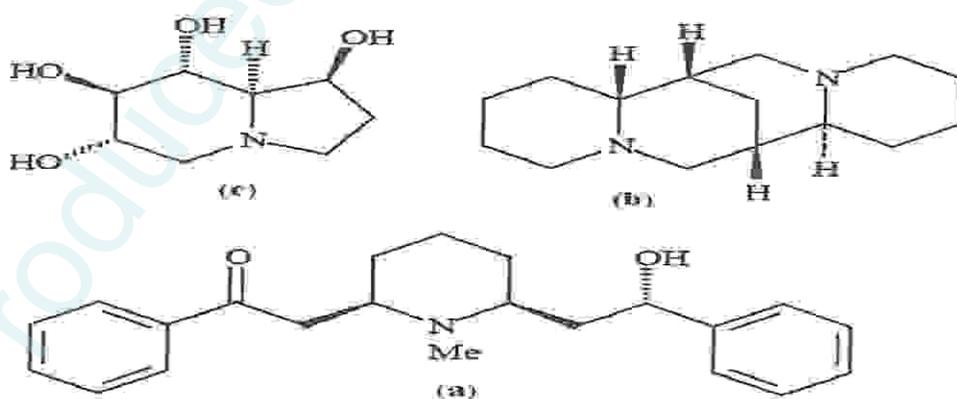


Fig.6: Structure chimique de : (a) Lobéline, (b) Sparteine
et (c) Castanospermine (Mauro, 2006).

1.3.5. Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique

L'acide anthranilique contribue à l'élaboration de quinazolines, des quinoléines et également des acridines. Pour donner quelques exemples dans ce groupe, nous pouvons citer : Fébrifugine (*Dichroa febrifuga*) et Acronycine (*Acronychia baueri*) (Fig.9).

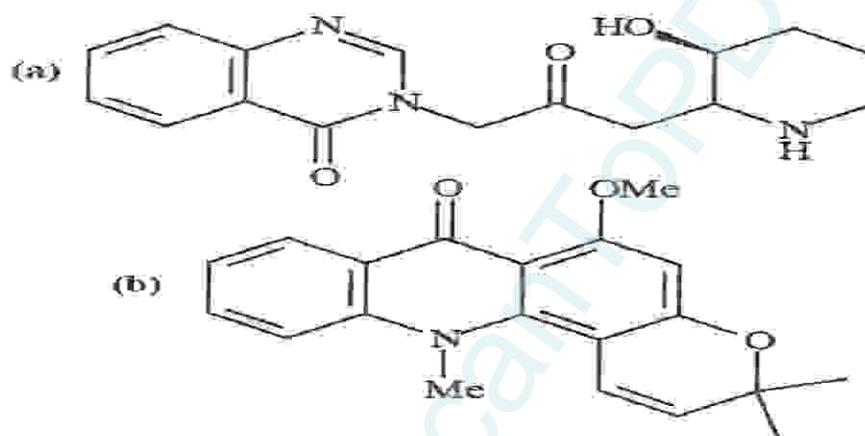


Fig.9 : Structure chimique de : (a) Fébrifugine, (b) Acronycine (Mauro, 2006).

1.3.6. Alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique

Les composés de cette série comportent une structure pyridine centrale et se trouvent principalement dans les feuilles du tabac. Les représentants majeurs sont : la nicotine (*Nicotiana tabacum*) et l'anabasine (*Nicotiana glauca*) (Fig.10).

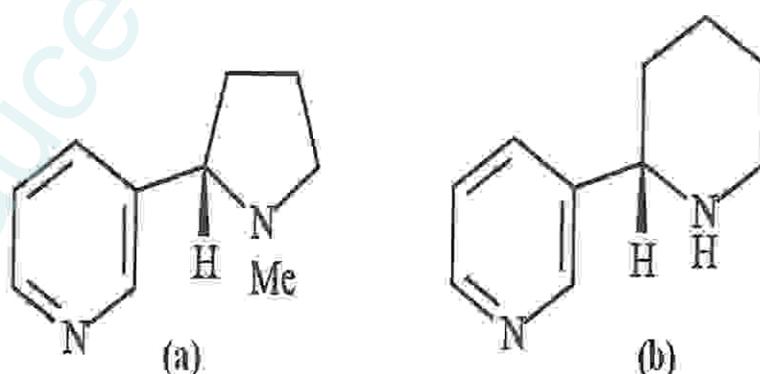


Fig.10 : Structure chimique de : (a) Nicotine, (b) Anabasine (Mauro, 2006).

1.3.7. Alcaloïdes dérivés de l'histidine

L'histidine comporte un motif imidazole et il est donc probable que cet aminoacide soit le précurseur des imidazoles naturels. Mais peu d'évidences confirment de façon définitive cette hypothèse. Un composé de ce groupe, important dans le domaine médical, est la pilocarpine (*Pilocarpus pennatifolius*), utilisée en ophtalmologie dans le traitement du glaucome (Fig.11).



Fig.11 : Structure chimique de Pilocarpine (Mauro, 2006).

1.3.8. Alcaloïdes produits à partir de réactions d'amination

Les alcaloïdes terpéniques et les alcaloïdes stéroïdiens entrent dans cette catégorie. La solasodine isolée de *Solanum laciniatum*, et la bufaline isolée d'une grenouille (Fig.12), sont intéressants d'un point de vue pharmacologique, en raison de leurs propriétés anticancéreuses. La bufaline est active contre la leucémie, les tumeurs hépatiques et le cancer de la prostate.

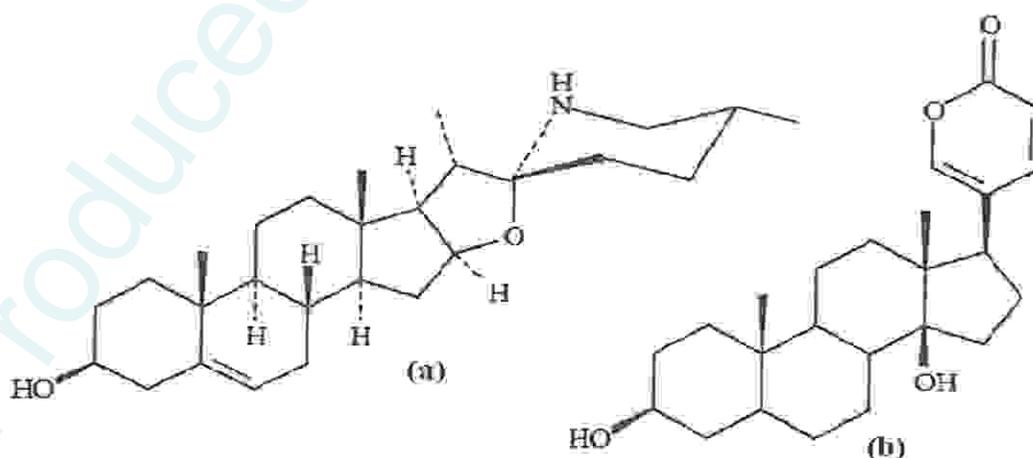


Fig.12 : Structure chimique de : (a) Solasodine, (b) Bufaline (Mauro, 2006).

1.4. Nomenclature des alcaloïdes

Comme la plupart des molécules naturelles, les alcaloïdes pourraient être nommés par la nomenclature systématique UICPA (Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée) de façon précise, mais cela donnerait souvent des noms très complexes, par exemple la morphine : [(5, 6)-7,8-didéhydro- 4,5-époxy-17-méthylmorphinan-3,6-diol], la nicotine : [3-[(2S)-1-méthylpyrrolidin-2-yl] pyridine].

De façon plus pratique, la plupart des noms donnés aux alcaloïdes proviennent de la plante de laquelle ils ont été extraits, par exemple : la kopsine (plante *kopsia fruticosa*), la papavérine (plante papaver) ou l'atropine (plante *atropia belladonna*). Lorsque plusieurs alcaloïdes sont extraits de la même plante, ces molécules portent la même racine de nom, avec un suffixe différent comme : -ine, -idine, -anine, -inine, etc. En ce qui concerne les alcaloïdes synthétiques sont de structures simples, alors la nomenclature UICPA est utilisée (Hess, 2002).

1.5. Propriétés physico-chimiques et biologiques des alcaloïdes

1.5.1. Propriétés physico-chimiques

La masse moléculaire des alcaloïdes est généralement faible et dépasse rarement 1000Da. La plupart sont des solides cristallisés. Quelques-uns se présentent sous forme de liquides volatils à la température ordinaire (nicotine,coniine, mescaline), mais leurs sels sont cristallisés. Les alcaloïdes sont, en général, insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants « organiques » (alcools, acétone, chloroforme, oxyde d'éthyle, etc.), tandis que leurs sels ont des caractères de solubilité inverses.

La couleur dépend du spectre d'absorption de la lumière lié à la structure moléculaire : beaucoup absorbent les rayonnements dans le proche ultraviolet (U.V.) et, dans certains cas, cette absorption déborde sur le spectre visible, d'où une coloration jaune à orangé (berbérine, ellipticine), voire rouge (sanguinarine).

L'existence d'atomes de carbone asymétriques dans leur structure confère à la plupart des alcaloïdes un pouvoir rotatoire, parfois élevé et caractéristique, par déviation du plan de la lumière polarisée.

La plupart des alcaloïdes sont basiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent fixer un proton (ion H^+) sur un atome d'azote. Cette propriété est à l'origine de la formation des sels avec les acides (chlorure ou sulfate). Elle est mesurée par la constante de dissociation apparente (pK_a) dans un solvant approprié (eau, méthylcellosolve), caractéristique intéressante à connaître pour l'extraction et le fractionnement des alcaloïdes d'une plante (Catiër & Roux, 2007).

1.5.2. Propriétés biologiques

Les alcaloïdes sont des composés nécessaires pour l'activité de cellules et la réalisation de code de gènes dans le génotype. Ils ont un effet sur les connexions entre les gènes, enzymes et protéines dans l'organisme. Les alcaloïdes sont biologiquement significatifs ; stimulateurs, inhibiteurs actifs de croissance, et régulateurs de sécurité endogène.

Ils ont des propriétés antimicrobiennes et antiparasitaires. D'ailleurs, ils jouent un rôle très important dans le système immunitaire des animaux et des plantes.

Des études récentes ont montré que les alcaloïdes ne sont pas toxiques aux organismes qui les produisent, cette bio-toxicité est dirigée seulement contre les organismes étrangers, elle est sélective et dépend de différents organismes et de la structure chimique des alcaloïdes eux-mêmes.

Les alcaloïdes individuels ne jouent pas un seul rôle. Le même alcaloïde dans la même cellule avec des conditions différentes, est capable de changer sa structure et de ce fait son activité biologique.

Le métabolisme d'alcaloïdes est génétiquement codé, jusqu'ici plus de 30 gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse d'alcaloïde ont été identifiés (Aniszewski, 2007).

1.6. Alcaloïdes et plantes médicinales

Jusqu'ici, plus de 100 000 structures différentes de métabolites secondaires ont été découvertes à partir de plantes. Les mieux étudiés sont les alcaloïdes, avec un nombre total de 21120 trouvés chez les monocotylédones, dicotylédones et de gymnospermes (ils sont

principalement extraits des plantes fleurissantes) (Mauro, 2006). Plus de 12 000 alcaloïdes ont été structurellement caractérisés.

Les alcaloïdes s'accumulent en environ 20 % de toutes les espèces des plantes et ont attiré beaucoup d'intérêt due à leurs fortes propriétés physiologiques permettant leur utilisation comme pharmaceutiques ou pesticides (Häkkinen, 2008). Ils sont extraits de plantes médicinales qui appartiennent principalement à quatre familles botaniques : les Papavéracées (pavots, coquelicots), les Papilionacés (fabacées ou « légumineuses »), les Renonculacées (Aconit, Hellébore) et les Solanacées (belladone, jusquiame).

Les plantes les plus connues en thérapeutique et toxicologie sont principalement le Belladone, datura, jusquiame, quinquina, coquelicot, Pervenche de Madagascar (Fig.13), pavot, cigüe, piment, funeterre, colchique, caféier, théier... (Vernex, 2011).

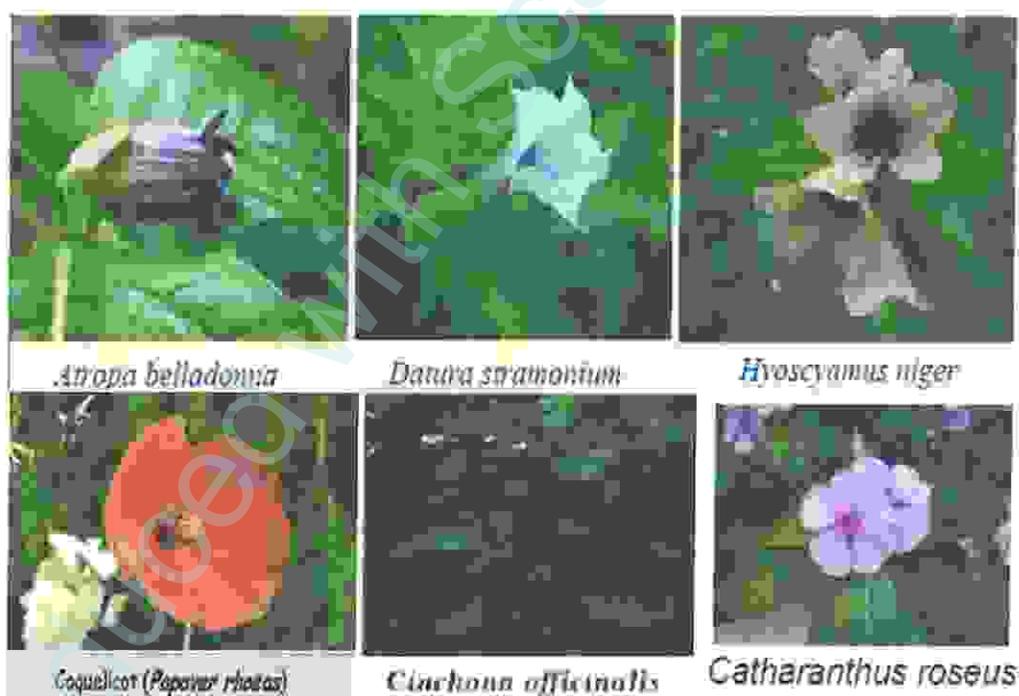


Fig.13 : Principales plantes médicinales à alcaloïdes (Iserin, 2001).

Parmi les principaux travaux ayant conduit à l'extraction et purification des alcaloïdes à partir des plantes, nous citerons le principal remède contre la douleur, la morphine extraite du pavot (*Papaver somniferum*) et celui utilisé contre le paludisme, la quinine extraite des quinquinas (*Cinchona spp.*).

Ces succès ont incité les scientifiques au XX^e siècle à chercher et étudier les substances naturelles à partir de plantes médicinales ou vénéneuses qui ont abouti à l'isolement de grande classe d'anticancéreux telle que la vinblastine extraite de la Pervenue de Madagascar (*Catharanthus roseus*) (Bruneton, 1993).

Produced with ScanTOPDF

2. Généralité sur le système immunitaire

Le système immunitaire est l'un des grands systèmes physiologiques des vertébrés. Il joue un rôle de défense important contre les agents agresseurs externes (molécules diverses, bactéries, virus, parasites) ou internes (cellules cancéreuses) et entraîne leur élimination.

2.1. Notions du "soi" et du "non-soi"

Normalement, l'action défensive du système immunitaire ne peut s'exercer vis-à-vis des propres constituants de l'organisme auquel ils appartiennent. L'une de ses caractéristiques est, précisément, d'être capable de reconnaître spécifiquement un nombre pratiquement infini de molécules différentes (antigènes), tout en faisant une distinction entre celles qui appartiennent à l'organisme qu'il protège (antigènes du « soi ») et celles qui sont étrangères à ce même organisme (antigènes du « non-soi »). Toute transgression à cette règle de reconnaissance du « soi » entraîne des manifestations pathologiques (maladies auto-immunes par exemple).

Il existe à la surface de toutes les cellules de l'organisme, des macromolécules spécifiques jouant le rôle de marqueurs antigéniques du « soi ». Leur ensemble constitue une carte d'identité biologique propre à chaque individu au sein d'une espèce donnée. Exemple : antigènes des groupes sanguins humains ; molécules d'histocompatibilité codées par le système HLA. Très tôt au cours de son développement, le système immunitaire apprend à ne pas réagir contre ces molécules du soi (Cânu & Petter, 2001).

2.1.1. Système HLA (complexe majeur d'histocompatibilité humain)

Le système HLA (*human leucocyte antigen*), un ensemble important de gènes, codant des molécules glycoprotéiques (antigènes d'histocompatibilité), présentes à la surface des cellules et impliquées dans les rejets de greffe.

Le système HLA est situé sur le chromosome 6 ; les gènes (et les molécules qu'ils codent) portent le nom du locus qu'ils occupent (A, B, C et D) (Fig.14). Seuls les gènes A, B, D et les molécules qu'ils codent, font l'objet d'un typage lors d'une greffe. Les molécules HLA ont les fonctions suivantes :

- Elles définissent l'identité biologique d'un individu : exprimées à la surface des cellules de l'organisme, elles sont reconnues comme « soi » par le système immunitaire de cet individu.

- Un rôle important dans la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T : au cours de la phagocytose, de petits peptides provenant de l'agent infectieux s'associent aux molécules HLA exprimées à la surface des macrophages. L'ensemble "molécule HLA-peptide antigénique" est reconnu comme « non-soi » par les différents lymphocytes T de l'organisme, et une réponse immunitaire spécifique se produit.

Les molécules HLA de classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules de l'organisme ; au cours des infections à des agents intracellulaires, elles s'associent à un peptide d'origine virale ou bactérienne. Les molécules HLA de classe II ont une expression plus réduite : on les trouve surtout à la surface des phagocytes jouant le rôle de cellules présentatrices d'antigène, comme les macrophages (Canu & Petter, 2001).

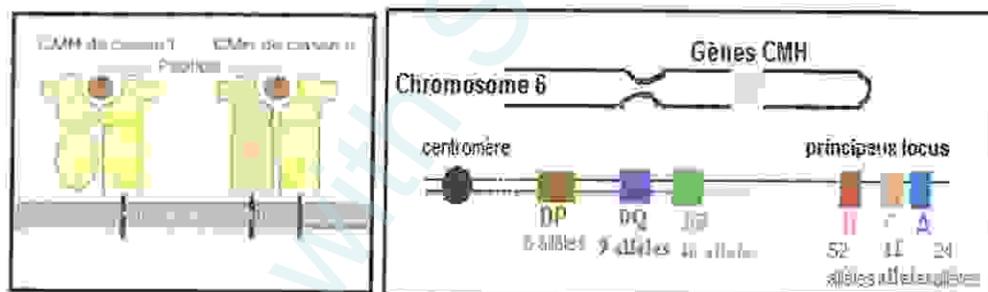


Fig.14 : Structure du CMH I et II et les gènes qu'ils codent (Parham, 2003).

2.2. Composants du système immunitaire

2.2.1. Cellules de la lignée myéloïde et de la lignée lymphoïde

Les leucocytes sont issus de la multiplication puis de la différenciation de cellules souches multipotentes au cours d'un processus appelé hématopoïèse. Cette production des leucocytes se fait autour de deux grands axes générés par deux cellules progénitrices directement issues de la différenciation de la cellule souche hématopoïétique :

- le progéniteur lymphoïde commun (CLP), génère la lignée lymphoïde ;
- le progéniteur myéloïde commun (CMP), génère la lignée myéloïde.

2.2.1.1. Cellules de la lignée myéloïde

Cette lignée, issue du CMP (le progéniteur myéloïde commun), fournit la majorité des cellules du système immunitaire inné, elle comprend :

a) Lignée monocyttaire

Les monocytes (**Fig.15**) représentent 3 à 10 % des globules blancs. Leur demi-vie dans le sang est d'une dizaine d'heures, ils migrent ensuite dans les tissus en se différenciant en deux types cellulaires distincts :

- **Macrophages** : ce sont de grosses cellules aux contours très irréguliers ménagés par de nombreux pseudopodes (**Fig.15**). Les macrophages sont activés par de nombreuses molécules microbiennes car ils possèdent de nombreux PRR (récepteurs reconnaissant des motifs) et récepteurs aux opsonines (récepteurs pour la portion Fc : RFc et récepteurs aux compléments : CR). Sous l'action de ces molécules, ils passent de l'état de repos à l'état activé. Une coopération avec les lymphocytes T *helper* (Th), les conduit vers un état superactif, notamment sous l'effet de l'interféron γ (IFN- γ). Les fonctions immunitaires majeures des macrophages sont : la phagocytose, la sécrétion de cytokines et présentation de l'antigène aux lymphocytes.

- **Cellules dendritiques** : ces cellules sont présentes dans tous les tissus de l'organisme à l'exception du cerveau et constituent de 0,2 à 2 % de leur masse cellulaire. Elles ont la particularité de posséder de nombreux prolongements de leur membrane plasmique (**Fig.15**). La fonction principale de toute cellule est de mettre en route la réponse immunitaire adaptative par leur capacité à reconnaître et capter efficacement les micro-organismes. Elles constituent alors les principales cellules présentatrices de l'antigène (Espinosa & Chillet, 2006).

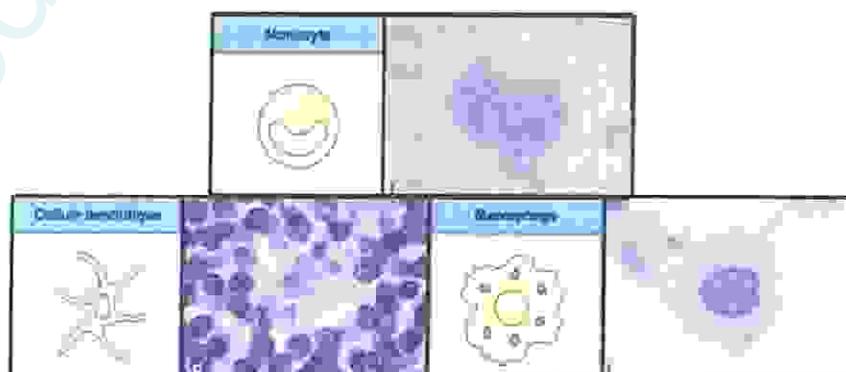


Fig.15 : Cellules immunitaires de la lignée monocyttaire (Parham, 2003).

b) Lignée granulocytaire

On distingue 3 types cellulaires de cette lignée :

- **Granulocytes neutrophiles** : ces cellules sont les plus nombreuses du sang. Leur demi-vie dans le sang est assez courte (moins de 24 heures). Elles entrent massivement dans les tissus lors de la réponse inflammatoire, et sont les premières à être recrutées dans les tissus infectés. Les granules des neutrophiles contiennent de nombreuses enzymes et molécules antimicrobiennes (Fig.16).

- **Granulocytes basophiles** : ces cellules circulent dans le sang et représentent moins de 1% des globules blancs. Elles sont les plus petits des granulocytes (environ 10 à 12 μm) (Fig.16). Leur contenu, riche en histamine, est déversé dans les tissus notamment lors des réactions allergiques.

- **Granulocytes éosinophiles** : ces cellules circulent 6 à 8 heures dans le sang. La fonction principale de ces cellules est la lutte antiparasitaire (Fig.16) (Espinosa & Chillet, 2006).



Fig.16 : Cellules immunitaires de la lignée granulocytaire (Parham, 2003).

c) Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules tissulaires, d'aspect mononucléée, dont le cytoplasme contient des granules sécrétoires (Fig.17). Ils sont distribués dans tout l'organisme, notamment au niveau des muqueuses. Les mastocytes sont caractérisés par l'expression du récepteur de haute affinité pour la partie Fc des IgE (RFc ϵ I). Ces cellules sont impliquées dans la réaction inflammatoire, les défenses antimicrobiennes mais aussi dans les manifestations allergiques (Espinosa & Chillet, 2006).

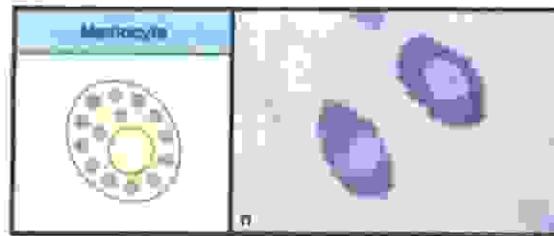


Fig.17 : Mastocytes (Parham, 2003).

2.2.1.2. Cellules de la lignée lymphoïde

Par définition, les cellules de la lignée lymphoïde dérivent du précurseur : le CLP (progéniteur lymphoïde commun). Ces cellules sont présentes essentiellement dans le système lymphatique. Les trois grandes classes de lymphocytes sont :

- **Lymphocytes T** : ces cellules finissent leur maturation dans le thymus. Chaque cellule est caractérisée par l'expression d'un récepteur pour l'antigène c'est le TCR (Fig.18), qui lui est propre et lui confère une spécificité vis-à-vis d'un antigène donné. Selon l'expression de récepteurs caractéristiques, on distingue : les lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$.

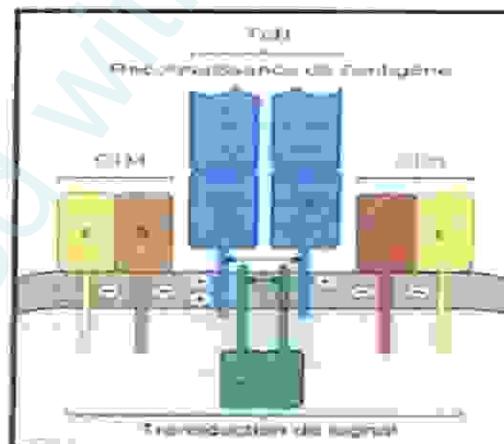


Fig.18 : Récepteur des cellules T (TCR) (Parham, 2003).

- **Lymphocytes B** : la maturation de ces cellules a lieu dans la moelle osseuse. Chaque cellule est caractérisée par l'expression d'un récepteur pour l'antigène c'est le BCR (Fig.19), qui lui est propre et lui confère une spécificité vis-à-vis d'un antigène donné. Ce récepteur est une immunoglobuline M membranaire. Les lymphocytes B se différencient, au cours de la réponse immunitaire adaptative humorale, en plasmocytes sécrétant les anticorps (Fig.19).

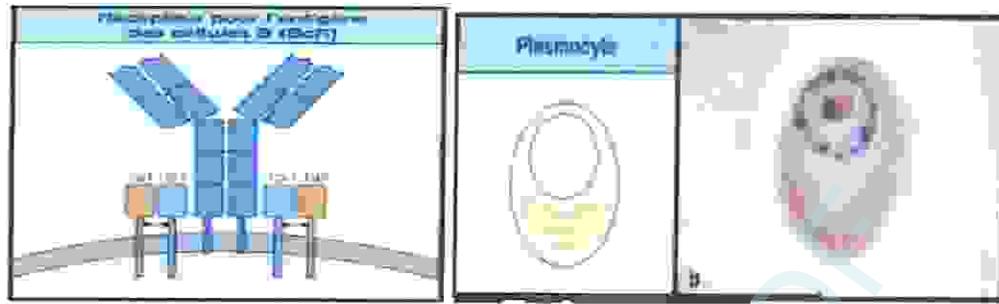


Fig.19 : Récepteur des cellules B (BCR) et plasmocytes (Parham, 2003).

- **Cellules NK (Natural Killer) (Fig.20)** : ces cellules circulent en permanence dans le sang et représentent en moyenne 15 % des lymphocytes sanguins. Leur demi-vie est d'une dizaine de jours. Les cellules NK sont des cellules cytotoxiques spécialisées dans la lyse des cellules tumorales ou infectées par des virus. Les NK font partie de l'immunité innée mais interviennent aussi dans l'immunité spécifique par le phénomène de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) (Espinosa & Chillet, 2006).

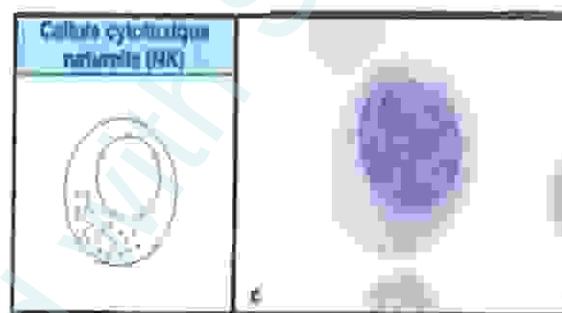


Fig.20 : Cellules NK (Parham, 2003).

2.2.2. Organes primaires et secondaires

2.2.2.1. Organes lymphoïdes primaires

Les organes lymphoïdes primaires assurent la production de toutes les lignées cellulaires du système immunitaire et notamment des lymphocytes matures. La moelle osseuse et le thymus sont les deux organes lymphoïdes primaires chez l'homme adulte (Fig.21). La moelle osseuse produit toutes les cellules du système immunitaire et assure la maturation des lymphocytes B. La maturation des lymphocytes T est assurée par le thymus.

2.2.2.2. Organes lymphoïdes secondaires

Les organes lymphoïdes secondaires constituent des sites où se déroule la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes matures issus des organes lymphoïdes primaires y recirculent en permanence dans l'attente d'une éventuelle rencontre avec l'antigène.

Il s'agit des très nombreux ganglions situés sur le trajet de la lymphe, de la rate, des amygdales et d'autres formations moins bien structurées, telles que les plaques de Peyer de l'intestin (Fig.21). Les lymphocytes B et T peuvent recirculer en permanence entre les différents organes lymphoïdes secondaires via la lymphe et le sang (Espinosa & Chillet, 2006).

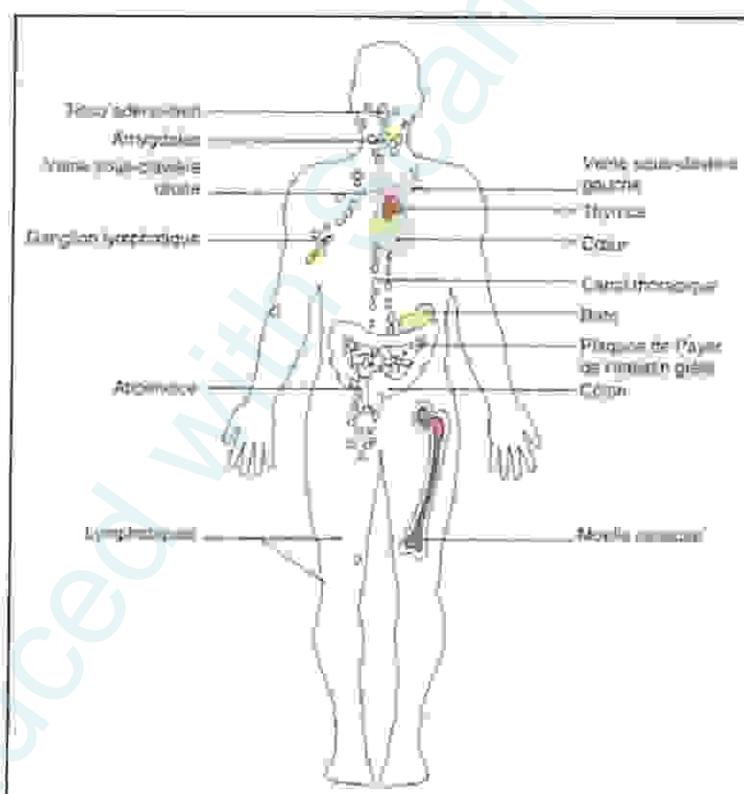


Fig.21 : Organes primaires et secondaires (Parham, 2003).

2.3. Immunité innée (ou non spécifique)

C'est l'un des deux processus de résistance (avec l'immunité spécifique) dont dispose l'organisme pour se défendre contre ses différents agresseurs. L'immunité non spécifique intervient spontanément et immédiatement, car elle ne nécessite aucune reconnaissance «

non-soi » pour se mettre en place. Différents facteurs mécaniques, chimiques physiologiques, cellulaires (phagocytes), et sériques (complément) contribuent à l'immunité non spécifique. Tous ces facteurs participent à la réaction inflammatoire, qui est l'expression de l'immunité non spécifique.

2.3.1. Facteurs mécaniques, chimiques et physiologiques

2.3.1.1. Facteurs mécaniques ; Barrière cutanéomuqueuse et différentes sécrétions

- La peau saine, grâce à ses nombreuses couches cellulaires, est infranchissable par la grande majorité de bactéries. Une blessure, une plaie, des brûlures profondes ou étendues diminuent son efficacité protectrice et favorisent la pénétration des agents infectieux.

- Les muqueuses, constituées d'une seule assise de cellules, sont beaucoup plus fragiles ; de plus, elles représentent, en raison de l'importance de leur superficie, une porte d'entrée fréquente pour les micro-organismes.

- La salive, les larmes, l'urine ou le mucus recouvrant les cellules épithéliales et balayé sans arrêt par le mouvement des cellules ciliées (au niveau de l'arbre bronchique par exemple), aident à l'élimination des germes de la surface des différentes muqueuses.

2.3.1.2. Facteurs chimiques

Le pH acide de l'estomac ou de la muqueuse vaginale empêchent leur colonisation par les micro-organismes. La présence d'acides gras organiques toxiques pour les bactéries, d'enzymes (tels que le lysozyme), dans diverses sécrétions (sébacées, salivaires), complète la défense locale de la peau et des muqueuses.

2.3.1.3. Facteurs physiologiques

- Les très jeunes enfants (moins de 3 ans) ou les sujets très âgés (plus de 75 ans) ont une immunité non spécifique moins efficace et sont donc plus sensibles aux infections.

- L'équilibre hormonal influe sur la réponse non spécifique : une augmentation de synthèse d'hormones stéroïdes diminue la réponse inflammatoire et la résistance aux infections. C'est pourquoi les sujets traités par les corticoïdes sont plus susceptibles aux infections.

- La malnutrition diminue l'efficacité du système immunitaire. C'est la raison pour laquelle des maladies infantiles sans gravité dans les pays industrialisés, sont à l'origine d'une mortalité très élevée dans les pays en voie de développement (rougeole par exemple).

- La température normale du corps humain (37°C) inhibe la croissance de nombreuses bactéries (en particulier celles de l'environnement) ; de même, l'élévation de température accompagnant les états infectieux, due à l'action de l'IL-1 sur l'hypothalamus, limite la multiplication des germes pathogènes (leur température optimale de croissance étant de 37°C) (Canu & Peter, 2001).

2.3.2. Facteurs cellulaires

La phagocytose est un élément important de l'immunité non spécifique. On appelle phagocytose le processus par lequel des particules (bactéries, molécules diverses) sont ingérées et détruites par une cellule.

Les phagocytes sont les cellules spécialisées dans la phagocytose, les plus importants sont les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages qui ont les propriétés suivantes :

- **Mobilité** : elles peuvent quitter les capillaires sanguins et migrer dans les tissus après avoir traversé l'endothélium vasculaire, en s'infiltrant entre les cellules endothéliales. C'est la diapédèse, favorisée par la réaction inflammatoire.

- **Chimiotactisme** : le déplacement et la migration des phagocytes sont orientés par des substances chimiques appelées substances chimiotactiques. Ces substances proviennent du sérum (dérivés du complément), des bactéries (lipopolysaccharide des germes Gram négatifs) ou des cellules lésées.

- **Phagocytose** : elle se produit en plusieurs étapes : adhérence du phagocyte à sa paroi, ingestion, digestion et expulsion des déchets hors de la cellule (Canu & Peter, 2001).

Les cellules NK assurent une défense précoce contre certaines infections intracellulaires, et participent à la défense non spécifique antivirale et anti-tumorale de l'organisme. Leur action cytotoxique est augmentée par l'IFN α , β , IL-2 et IL-12.

2.3.2. Système du complément

On appelle système du complément un groupe d'une vingtaine de protéines présentes sous forme inactive dans le sérum normal, en dehors de toute immunisation. Les composants majeurs sont désignés par la lettre C suivie d'un chiffre (indiquant l'ordre dans lequel ils ont été découverts). Il s'agit des composants C1 à C9.

Sous l'influence des signaux de nature variable (présence de complexes Ag-Ac, de produits bactériens), les protéines sériques inactives du système du complément interréagissent entre elles et donnent naissance à des composés actifs participant à la réaction inflammatoire.

- Certains d'entre eux (anaphylotoxines) agissent sur les mastocytes et les basophiles, qui libèrent de l'histamine à propriétés vasodilatatrices.

- D'autres sont de puissants agents chimiotactiques et attirent les phagocytes vers le foyer inflammatoire.

- Un composé résultant de l'activation du C3, le C3b, est une opsonine : il se fixe à la surface des micro-organismes. Les phagocytes, grâce à des récepteurs membranaires spécifiques, viennent se fixer sur le C3b recouvrant les bactéries. Les deux types de cellules adhèrent fortement l'un à l'autre, et la phagocytose s'en trouve facilitée.

- Enfin le complément permet la destruction des cellules étrangères par lyse. Elle résulte de la formation d'un complexe moléculaire (constitué par l'association des composés C5b, 6, 7, 8 et 9) à la surface de la cellule. Ce complexe crée de multiples perforations à travers la membrane cellulaire, ce qui entraîne la fuite extracellulaire du contenu cytoplasmique et la mort de la cellule (Canu & Peter, 2001).

2.3.3. Réaction inflammatoire

C'est la réaction tissulaire qui se produit lors d'une infection, d'une blessure, d'une lésion mécanique ou chimique, d'une irritation chronique ou lors de tout autre type d'agression. Elle est non spécifique de l'agresseur, se développe dans le tissu conjonctif et mobilise les cellules du compartiment vasculaire.

De nombreux médiateurs, de nature très variée (produits provenant de l'activation du complément, histamine, cytokines d'origine mono macrophagique) interviennent dans la réaction inflammatoire. Les quatre symptômes caractéristiques de la réaction inflammatoire sont : rougeur, chaleur, douleur et tuméfaction.

2.3.3.1. Déroulement

La réaction inflammatoire débute par une vasodilatation des capillaires sanguins locaux (d'où la rougeur et la chaleur) et une augmentation de leur perméabilité avec passage de liquide du système circulatoire vers les tissus (d'où la tuméfaction). La douleur provient des lésions subies par les neurones sensitifs locaux.

La vasodilatation, en entraînant un ralentissement du débit sanguin, favorise la diapédèse des phagocytes (traversée des parois vasculaires, au niveau des jonctions des cellules endothéliales) et leur migration vers le foyer inflammatoire. Les premières cellules à y parvenir sont les polynucléaires, suivis plus tard par les macrophages. Des substances chimiotactiques élaborées localement par les cellules lésées, les orientent vers le foyer inflammatoire.

2.3.3.2. Rôles de la réaction inflammatoire

Elle joue à la fois un rôle bénéfique et un rôle néfaste :

- son rôle bénéfique est dû au fait que la réaction inflammatoire agit comme un signal d'alerte permettant à l'organisme de mobiliser très rapidement les cellules phagocytaires. Elles détruisent rapidement les bactéries éventuellement présentes au niveau de la lésion et empêchent ainsi leur dissémination et l'extension de l'infection. Elles éliminent également les cellules lésées et préparent le processus de cicatrisation.

- l'aspect néfaste se traduit par une destruction tissulaire locale. L'expulsion dans le milieu extracellulaire du contenu très acide et riche en enzymes des vacuoles de digestion entraîne la destruction des phagocytes eux-mêmes et des cellules environnantes, avec formation de "pus" et d'une lésion tissulaire plus ou moins importante, pouvant aller jusqu'à la nécrose. La guérison se traduit par l'élimination de l'agent agresseur, et la réparation des tissus lésés (par cicatrisation, à laquelle participent les fibroblastes) (Canu & Peter, 2001).

2.4. Immunité adaptative (ou spécifique)

Elle complète l'action protectrice de l'immunité non spécifique. Elle se met en place après l'immunité non spécifique, car elle fait intervenir les lymphocytes B et T, dont le recrutement, la multiplication et la différenciation nécessitent quelques jours entre la pénétration de l'agresseur et l'apparition des premiers anticorps ou lymphocytes T effecteurs spécifiques. Il existe 2 types d'immunité spécifique : Immunité humorale et immunité à médiation cellulaire.

2.4.1. Immunité humorale et production des anticorps

L'immunité humorale spécifique est due à la synthèse d'anticorps réagissant seulement avec l'antigène ayant provoqué leur formation.

2.4.1.1. Caractéristiques générales des immunoglobulines

Les Ac (ou immunoglobulines) sont des protéines synthétisées par un animal en réponse à la présence d'une substance étrangère. Ils sont sécrétés par les plasmocytes qui dérivent des lymphocytes B.

Ces protéines solubles sont des éléments de reconnaissance de la réponse immunitaire humorale. Une macromolécule étrangère capable de provoquer la formation d'un Ac est appelée antigène (ou immunogène). Il n'y a pas d'affinité spécifique d'un Ac pour un Ag macromoléculaire dans son ensemble mais pour un site particulier de celui-ci appelé déterminant antigénique (ou épitope). Les Ig sont des glycoprotéines dont la structure primaire est conservée du côté C terminal et variable du côté N-terminal.

Sur le protéinogramme du sérum sanguin, elles correspondent au pic des Gammaglobulines. On en décrit cinq classes dans le sérum de l'adulte sain (Fig.22) :

- **IgG** : environ 80% des Ig sériques. Les IgG ont une demi-vie de 27 jours avec un taux sériques de 8 à 12 g/l.

- **IgA** : elle constitue 10 à 15% des Ig sériques mais prédomine largement dans les sécrétions où elles jouent un rôle primordial dans les défenses de l'organisme contre les agressions externes. La demi-vie est de 8 jours avec un taux sérique de 1 à 4 g/l.

- **IgM** : constituée de 5 sous-unités, l'IgM est la première Ig qui apparaît au cours de la réponse immunitaire et aussi la première qui est produite par le nouveau-né. Le taux sérique est de 0,8 à 1,2g/l.

- **IgE** : malgré leur faible concentration dans le sérum (0,15 à 0,5mg), les IgE jouent un rôle considérable en immuno-pathologie.

- **IgD** : bien que leur rôle reste mal compris, les IgD représentent par ailleurs l'une des deux classes majeures des Ig de membrane sur les cellules B. Le taux sérique est de 0,2 à 0,25g/l (Fofana, 2004).



Fig.22 : Organisation structurale des immunoglobulines (Parham, 2003).

2.4.1.2. Rôle des lymphocytes T dans la production des anticorps

90 % des antigènes dits thymo-dépendants, n'entraînent la formation d'anticorps qu'après coopération des lymphocytes B avec des lymphocytes T "auxiliaires" ou lymphocytes CD4⁺.

Ces lymphocytes T CD4⁺, reconnaissent le motif antigénique associé aux molécules CMH II à la surface des macrophages, grâce à un récepteur spécifique bicaténaire de structure complémentaire appelé TCR (*T cell receptor*).

Le TCR transmet un signal d'activation à la cellule. Les lymphocytes T auxiliaires synthétisent alors diverses cytokines, dont certaines favorisent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes (Canu & Peter, 2001).

2.4.1. Immunité à médiation cellulaire

Elle diffère fondamentalement de l'immunité humorale par le fait qu'elle ne peut être transmise passivement, d'un sujet immunisé à un sujet non immunisé, par l'intermédiaire du sérum seul. La transmission passive nécessite la présence de cellules.

In vivo, elle intervient dans la protection de l'organisme contre les micro-organismes intracellulaires (virus, certaines bactéries, parasites), dans le rejet de greffons allo-géniques (greffes effectuée entre un donneur et un receveur appartenant à la même espèce mais génétiquement différents), dans les réactions d'hypersensibilité retardée et dans la défense anti-tumorale. Parmi les cellules effectrices intervenant dans l'immunité à médiation cellulaire, les lymphocytes T CD4⁺, lymphocytes T CD8⁺ à propriétés cytotoxiques (Canu & Peter, 2001).

2.4.1.1. Activation et rôle des lymphocytes T cytotoxiques

Pour être activées et pouvoir jouer leur rôle cytotoxique les cellules Tc CD8⁺ doivent recevoir deux signaux :

- le premier signal correspond à la reconnaissance spécifique par les lymphocytes T_c grâce à leurs TCR, de peptides antigéniques « non-soi » associés aux molécules CMH I.

- le second signal est délivré par les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (ou lymphocyte Th), ayant reconnu de façon spécifique, par l'intermédiaire de leurs TCR, une association peptide « non-soi » - CMH II, située à la surface de macrophages. Cette reconnaissance entraîne l'activation des cellules Th, qui sécrètent alors différentes cytokines dont l'IL2 et INF γ . Ces cytokines favorisent la prolifération des cellules Tc et leur différenciation en cellules cytotoxiques capables de tuer les cellules cibles.

2.5. Notion d'immunostimulation et d'immunogénicité

2.5.1. Immunostimulation – Immunomodulation

L'immuno-stimulation est une notion qui est d'abord née de la notion d'adjuvant. Ainsi « l'adjuvant » se définit comme toute substance qui, injectée en même temps que l'antigène, augmente la réponse immunitaire envers celui-ci.

On a ensuite tenté de stimuler la capacité de la réponse immunitaire de façon globale en dehors du problème d'une réponse spécifique à un Ag, d'où la notion « immunostimulant ». Donc contrairement aux adjuvants qui augmentent le pouvoir immunogénique des Ag, les immunostimulants ont une action plus générale sur l'immunité, pouvant modifier spontanément plusieurs réactions immunitaires, grâce à une augmentation non spécifique et transitoire de la réactivité immunitaire. Cette stimulation peut être globale ou s'appliquer à un type de réponse particulier. Après un premier enthousiasme issu des résultats sur les cancers expérimentaux, il a fallu bien admettre que la stimulation du système immunitaire était une arme à double tranchant puisqu'elle peut agir aussi bien sur la suppression que sur la stimulation de la réponse immunitaire, d'où la notion « d'IMMUNOMODULATION », plus actuelle (Fofana, 2004).

2.5.2. Immunogénicité – Antigénicité

Afin d'éviter certaines confusions qui ont prévalu et qui continuent de l'être quant aux différentes définitions se rattachant aux substances immunologiquement actives il est essentiel de bien préciser la terminologie adoptée.

Antigénicité : l'antigénicité d'une substance est son aptitude à donner naissance à une réaction immunitaire. De façon plus adaptée, l'antigénicité est la propriété qui permet à certaines substances d'induire une réponse immunitaire une fois introduite chez un animal.

Immunogénicité : l'immunogénicité est la capacité d'une substance à induire la formation d'anticorps indépendamment de la spécificité de ceux-ci.

Spécificité antigénique : la spécificité antigénique est la capacité d'un Ag à réagir spécifiquement avec un Ac homologue, propriété se traduisant par la présence sur l'anticorps de sites de combinaison spécifiques de l'antigène.

Il est donc préférable de réserver le terme d'antigénicité pour désigner l'ensemble des deux propriétés d'immunogénicité et de spécificité antigénique.

L'expression du pouvoir immunogène d'une substance est influencée par plusieurs facteurs... il convient de définir très précisément : la structure, la dose, la voie d'administration, l'espèce animale, l'âge et les caractéristiques génétiques.

A nos jours les substances ayant fait preuve de leur pouvoir immunogène sont multiples et de natures variées, on distingue entre autres :

- des extraits bactériens
- des extraits fongiques
- des extraits de plantes
- des produits chimiques

En plus de leur action sur l'immunité humorale, ces substances ont d'autres activités sur le système immunitaire (Fofana, 2004).

3. Propriétés immunologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes font partie d'un groupe spécial de métabolites secondaires. Vu leurs propriétés pharmacologiques variées, et plus particulièrement immunologiques, anti-tumorale, anti-inflammatoire, antimicrobienne, ils constituent un champ large de recherches et d'investigations.

3.1. Effet antimicrobien

3.1.1. Effet antiviral

Plusieurs études récentes ont montré que beaucoup d'alcaloïdes possèdent des propriétés antivirales. Cela est directement lié au système immunitaire des organismes. Il est bien connu que les surfaces des virus contiennent l'hémagglutinine qui les aide à adhérer aux cellules avant l'infection. Les virus changent également et continuellement la structure de leurs antigènes extérieurs par des processus de dérive antigénique (*antigenic drift*) et de substitution antigénique (*antigenic shift*). Le processus drift est une mutation dans le génome viral et le shift est le changement d'un virus dans l'hôte. Ces processus mènent aux changements en hémagglutinine. L'infection ne peut se produire que si les changements en hémagglutinine sont suffisants pour rendre l'immunité inefficace.

Le rôle potentiel des alcaloïdes devient évident dans cette étape. Outre, l'activation des cellules T cytotoxiques antivirales, ces composés empêchent les changements de l'hémagglutinine qui empêche ces cellules à fonctionner normalement (Aniszewski, 2007).

Plusieurs études ont montré que le chlorhydrate de la papavérine (PAP) a un effet inhibiteur efficace sur la réplication du virus humain d'immunodéficience (HIV). Aussi et par des observations cliniques il a été confirmé que cet alcaloïde peut améliorer la réponse immunitaire cutanée dans le syndrome acquis d'immunodéficience (Nokta et al., 1993).

Un autre alcaloïde a montré un effet similaire sur le virus HIV, c'est la batzelladine isolée de l'éponge *Batzella sp.*, cet alcaloïde empêche l'interaction entre la glycoprotéine gp-120 d'HIV et les cellules CD4, et par conséquent l'inhibition de la réplication du virus (Patil et al., 1995).

3.1.2. Effet antibactérien

Les infections bactériennes créent un problème majeur de santé pour beaucoup d'organismes vivants. Les bactéries essaient d'échapper à la phagocytose en se protégeant par une capsule, cette dernière excrète des exotoxines censées pour tuer les cellules phagocytaires et détruire le système immunitaire.

Une étude faite sur les alcaloïdes extraits du noni (*Morinda citrifolia*) a affirmé la capacité de ces composés à contrôler ou détruire plus de six souches bactériennes telles que *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* en stimulant la phagocytose, un processus par lequel les macrophages et neutrophiles, attaquent et digèrent totalement les organismes infectieux (Younos et al., 1990). D'autre part, les alcaloïdes agissent directement sur les bactéries en inhibant leur croissance et leur réplication (Aniszewski, 2007).

La berberine, un alcaloïde majeur de *Coptidis rhizoma*, a une activité antibactérienne. Un de mécanismes possibles de cette activité peut être basé sur la production de l'interleukine-12 (IL-12). Des études ont démontré que les alcaloïdes 13-méthyl- et 13-éthylberberine peuvent être utilisés comme composés immuno-thérapeutiques pour l'induction d'IL-12, qui est potentiellement applicable pour les maladies infectieuses (Lee et al., 2003).

3.1.3. Effet antifongique

Les infections fongiques provoquent des problèmes très sérieux pour le système immunitaire de beaucoup d'organismes. Plusieurs alcaloïdes ont montré des propriétés anti-fongiques et leur influence sur les mycètes est approuvée par la réduction de leur croissance et par l'activation des cellules T et NK, qui exercent un effet cytotoxique aux mycètes (Aniszewski, 2007).

3.1.4. Effet antiparasitaire

La médecine traditionnelle et les études scientifiques ont prouvé que l'extrait d'*Evantia* a montré une activité anti-leishmanial. L'alcaloïde de cette plante a tué le parasite, et cela pourrait non seulement être due à l'action directe sur le parasite, mais probablement à un effet comutant sur la réaction immunitaire de l'hôte (Magarinos et al., 2009).

Une autre étude sur l'effet leishmanicide des alcaloïdes, s'est basée sur l'utilisation de la coronaridine, un alcaloïde indolique isolé de *Peschiera australis*. Cet alcaloïde révèle un effet leishmanicide efficace contre *Leishmania amazonensis* par sa capacité de tuer les amastigotes à l'intérieur des macrophages infectés *in vitro*, en les stimulant pour produire l'acide nitrique NO^- , le mécanisme le plus important dans la destruction des amastigotes à médiation immunologique (Delorenzi et al., 2002).

3.2. Effet anti-inflammatoire

Beaucoup d'alcaloïdes d'activité anti-inflammatoire ont été isolés tout au long des années 2000-2010. Parmi 49 alcaloïdes évalués, 40 ont montré un effet anti-inflammatoire. Les plus étudiés étaient les isoquinolines (Souto et al., 2011).

Les investigations ont démontré que la Decarine, un alcaloïde de bisbenzylisoquinoline isolé de *Zanthoxylum ailanthoides* et Henningsamine, un alcaloïde des indoles isolé de *Strychnos cathayensis*, ont des activités inhibitrices sur la génération du superoxyde par les neutrophiles dans le corps humain (Chen et al., 2009 ; Chen et al., 2008).

Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1 (IL-1) et le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) sont des médiateurs moléculaires efficaces. Ils sont produits par une grande variété de cellules, mais les monocytes et les macrophages représentent leur source principale. Ces polypeptides sont impliqués dans la pathogénèse de l'inflammation chronique.

Il y a donc un grand intérêt pour les alcaloïdes qui peuvent contrôler leur génération et/ou action. Il est montré que la tetrandrine, un alcaloïde de bisbenzylisoquinoline, est un inhibiteur efficace de la production $\text{IL-1}\beta$ et $\text{TNF-}\alpha$ par des cultures humaines de monocyte-macrophage (Seow et al., 1993).

Neuf alcaloïdes anti-inflammatoires de quinolone isolés des fruits *Evodia rutaecarpa*, ont été étudiés pour leur activité inhibitrice sur le facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT). Cette protéine est exprimée dans la plupart des cellules du système immunitaire et régule la transcription de gènes des cytokines critiques pour la réaction immunitaire telles que l'interleukine : 2, -3, -4, -5, -8, -13, facteur de stimulation des colonies de granulocyte-macrophage CGMSF, $\text{IFN-}\gamma$ et $\text{TNF-}\alpha$. Normalement l'activation de NFAT joue un rôle

principal dans la régulation d'un grand nombre des gènes indicibles pendant la réaction immunitaire. Cependant, l'activation excessive provoque des réactions immuno-pathologiques comprenant l'auto-immunité, le rejet de greffe et l'inflammation, donc le rôle de ces alcaloïdes devient crucial dans cette étape (Jin et al., 2004).

La colchicine, connue comme une drogue anti-inflammatoire, exerce sa fonction en supprimant la chimiotactisme des neutrophiles et la migration des granulocytes vers les zones inflammatoires (Altindag et al., 1996). D'autre part, Teb et ses collaborateurs (1990) ont prouvé que la tetrandine et son analogue naturel, la berbamine empêche la génération de la prostaglandine et des leucotriènes par les monocytes et les neutrophiles humains d'une façon dépendante de la dose.

L'arthrite rhumatoïde (RA) est une maladie inflammatoire chronique, elle est caractérisée par un dommage progressif dans l'os et le cartilage. Bien que la pathophysiologie précise de cette maladie demeure peu claire, mais généralement l'inflammation chronique et la réaction immunitaire anormale jouent un rôle crucial dans le développement du RA. Une étude récente a commencé d'étudier le potentiel thérapeutique de la norisoboldine, un alcaloïde isoquinoline, sur la RA, cette étude a confirmé que la norisoboldine a pu supprimer de manière significative *in vivo* les réponses immunitaires augmentées par les cellules T. Ces résultats suggèrent que la norisoboldine fonctionne en protégeant la destruction aussi bien qu'en réglant les réactions immunitaires anormales dans le cas de la RA (Luo et al., 2010).

3.3. Effet anti-tumoral

Le statut immunitaire de l'hôte joue un rôle crucial dans le contrôle du processus de la carcinogenèse. L'activation générale ou sélective de diverses cellules immunocompétentes et leur fonction pour maintenir un statut immunitaire sain peut aider à la prophylaxie du cancer, aussi bien que la thérapie.

Une étude récente faite par les deux chercheurs Hamsa & Kuttan (2011), s'est concentrée sur l'effet de l'Ipobscurine, un alcaloïde indolique isolé d'*Ipomoea obscura*, sur la réaction immunitaire à médiation cellulaire en analysant l'activité cytotoxique du lymphocyte T (CTL), l'activité de cellules NK, la cytotoxicité médiée par les cellules dépendante des anticorps (ADCC), et la cytotoxicité médiée par le complément dépendante des anticorps (ACC). L'effet de l'Ipobscurine sur IL-2 et IFN- γ a été également analysé. Dans les systèmes *in vitro* et *in vivo*, le traitement par l'Ipobscurine a activé la réaction immunitaire à médiation

cellulaire en stimulant l'activité des cellules CTL et NK de splénocytes dans la normale, aussi bien que l'ADCC, ACC, la production de l'IL-2 et IFN- γ .

Cette étude indique que l'Ipobscurine offre des possibilités intéressantes dans la stimulation de la réaction immunitaire par la sécrétion augmentée d'IL-2 et d'IFN- γ par les cellules T et d'empêcher par ce fait, la croissance des tumeurs et comme médecine alternative, pour le traitement du cancer.

La punarnavine est un alcaloïde présent dans la plante *Boerhaavia diffusa*, considéré comme le principe actif dans l'extrait de cette dernière. Les investigations ont démontré que la punarnavine a un effet antimétastatique, il peut activer la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre le mélanome métastatique chez la souris (Manu & Kuttan, 2007).

Chuchawankul et al. (2012) ont prouvé que la piperine, un alcaloïde isolé des fruits de *Piper nigrum* et *Piper longum*, pourrait montrer une activité anti-tumorale contre le lymphome humain des cellules T.

En outre, la wainsonine isolée pour la première fois de *Swainsona canescens*, ensuite identifiée dans beaucoup d'espèces *Astragalus* et *Oxytropis*, a attiré un grand intérêt par sa propriété antitumorale. Cet alcaloïde favorise les activités immuno-modulatrices anti-tumorales du système immunitaire en diminuant la suppression immunitaire induite par la tumeur et en stimulant l'activité tumeuricide médiée par les cellules NK, les macrophages et LAK (*lymphokine-activated killer*) (Galustian et al., 1994).

3.4. Effet immunomodulateur

3.4.1. Effet sur les lymphocytes T

Les effets de l'exposition continue du thymus fœtal (13-14 jours de gestation) à la nicotine ont été étudiés et les thymocytes ont été analysés par la cytométrie en flux.

En présence des concentrations très basses de la nicotine, beaucoup de cellules T immatures (définies par expression basse ou négative de TCR) et peu de cellules T matures (expression intermédiaire ou élevée de TCR) ont été produites. En outre, le nombre de cellules exprimant le CD69 et, à un moindre degré, le CD95 (Fas) a été augmenté. La nicotine semble conduire à l'activation, la sélection et l'expansion des cellules T. Ces études suggèrent

que la nicotine soit un agent immunopharmacologiquement efficace pour le comportement de cellules T dans la périphérie (Middlebrook et *al.*, 2002).

Dans d'autres expérimentations, la colchicine une fois administrée à des souris conjuguée avec l'Ag, a montré un effet adjuvant efficace en produisant une réponse immunitaire spécifique de l'Ag. L'explication de ce phénomène a indiqué que plusieurs activités de cellules T, y compris la fonction de Th et la prolifération des cellules T induite par l'Ag, ont été spécifiquement induites en traitant les souris avec la colchicine et l'Ag. Cette étude suggère que le pouvoir de la colchicine comme adjuvant est égal ou plus de celui des adjuvants conventionnels tels que le CFA (Antigène complet de Freund) (Titus, 1991).

Il est clair que l'activation des cellules T exige l'intégration de deux signaux : un signal de récepteur de cellules T et un autre signal de co-stimulation. Parmi les molécules exprimant des activités co-stimulatrices sur les cellules T, seulement le CD28 a pu, en combinaison avec l'activation du récepteur de cellules T, induire des niveaux détectables d'interleukine 2 et empêcher l'anergie, un statut d'insensibilité.

Une autre série d'études examinant les effets de l'alcaloïde tetrandrine sur les cellules T a été réalisée. Après le traitement des cellules T purifiées du sang périphérique par la tetrandrine, les résultats ont montré une inhibition de la fonction co-stimulatrice de la molécule CD28 et par conséquent, l'inhibition de la prolifération des cellules T et la production des cytokines (Lai et *al.*, 1999).

La propriété immunosuppressive de la berberine, a été bien documentée, mais le mécanisme de son action sur les lymphocytes n'a pas été complètement élucidé. Xu et *al.* (2005) ont étudié l'effet de la berberine sur l'activation et la prolifération des lymphocytes, en particulier lymphocytes T. La berberine a empêché de manière significative l'expression du CD69 et du CD25 sur les cellules T stimulées avec le phorbol dibutyrate (PDB) plus l'ionomycine ou phytohémagglutinine (PHA) seule. Ces résultats indiquent que la berberine inhibe l'expression des antigènes activant les lymphocytes T et bloque également leur progression du cycle cellulaire de G0/G1, donc la berberine peut exercer un effet immunosuppresseur en empêchant l'activation et la prolifération des cellules T.

3.4.2. Effet sur les lymphocytes B

Il a été prouvé que les alcaloïdes d'oxindoles pentacycliques (POA) d'*Uncaria tomentosa* incubés avec les cellules endothéliales augmentent la prolifération des lymphocytes B en repos ou faiblement activés. L'étude a montré que ces alcaloïdes n'affectent pas directement la prolifération mais induisent plutôt les cellules endothéliales à libérer un facteur régulateur qui influence la prolifération des lymphocytes B (Keplinger et al., 1999).

Il a été montré aussi que la bromocriptine (BRC), un alcaloïde de l'ergot de seigle, a un effet sur la fonction des cellules B humaines. Les cellules B hautement purifiées ont été isolées par le gradient de Percoll, et ont été employées comme des cellules cibles pour un traitement à la Bromocriptine. Ce composé a supprimé de manière significative la réponse proliférative des lymphocytes B en repos et activés *in vitro*. Il a inhibé aussi la production des immunoglobulines par les cellules B activées:

L'addition de la bromocriptine (BRC) a nettement empêché la synthèse de l'ADN des cellules B en repos aussi bien que chez les cellules B activées en présence ou en absence de facteurs de croissance. Ces résultats indiquent l'effet immunosuppresseur de la bromocriptine sur la prolifération des lymphocytes B, indépendamment de l'activation de son état (Morkawa et al., 1993).

3.4.3. Effet sur les cellules NK

Swainsonine, un alcaloïde de la famille des indolizidines, a prouvé d'être capable d'augmenter l'activité des cellules NK. En effet, la swainsonine est classifiée comme un immuno-modulateur (Humphries et al., 1988).

En outre les alcaloïdes de l'ergot de seigle (EAs), produits de *Claviceps spp.*, sont largement utilisés dans divers domaines de la médecine clinique. Leurs effets sur l'activation des cellules NK et leurs voies de signalisation, ont été bien étudiés. Fiserová et al. (1997) ont montré que tous l'EAs examinés, ont augmenté l'activité cytotoxique médiée par les cellules NK du rat *in vitro*.

3.4.4. Effet sur les macrophages

La berberine, un alcaloïde de la famille des benzodioxoloquinolizines, a montré un certain effet bénéfique comprenant l'immuno-stimulation et l'activation des macrophages.

Cet alcaloïde induit la production d'IL-12p 40, la plus grande sous-unité d'IL-12, dans les macrophages via l'activation de la protéine kinase p38 (Kang et al., 2002).

Les alcaloïdes d'oxindoles pentacycliques (POA) d'*Uncaria tomentosa* ont également prouvé un effet immunostimulant. Ils peuvent augmenter l'activité phagocytaire des macrophages (Keplinger et al., 1999).

Castranova et al. (1991) ont trouvé que les alcaloïdes de bisbenzylisoquinoline sont capables d'empêcher l'activation des macrophages alvéolaires induite par les particules, et cette inhibition a été corrélée avec la capacité de ces alcaloïdes de se lier aux composants de la membrane.

3.4.5 Effet sur les cellules dendritiques

La morphine peut affecter le système immunitaire, les récepteurs d'opiacé connus pour être exprimés sur les cellules du système nerveux central sont également exprimés sur les cellules du système immunitaire.

Une étude a prouvé avec succès que les cellules dendritiques qui font partie du système immunitaire inné, expriment aussi les récepteurs d'opiacé. Ces cellules sont responsables de la production des cytokines, médiateurs de la communication au niveau du système immunitaire. Cette même étude a prouvé que les cellules dendritiques chroniquement traitées avec la morphine pendant leur différenciation, produisent plus d'interleukine 12 (IL-12), une cytokine responsable de la prolifération, la croissance et la différenciation des cellules T, et moins d'interleukine 10 (IL-10), responsable de favoriser la réponse immunitaire des cellules B.

La régulation des cytokines semble se produire par l'intermédiaire du p38 MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*). La cellule dendritique exprime TLR 4 (*Toll-like receptor 4*), qui est activé par le ligand LPS (lipopolysaccharide), ce qui conduit à la phosphorylation de la protéine kinase p38 et par conséquent, la production des IL10 et IL12. Quand les cellules dendritiques sont chroniquement exposées à la morphine pendant leur différenciation puis traitées avec des LPS, la production des cytokines est différente. Une fois traitée avec la morphine, le p38 MAPK ne produit pas IL-10, mais favorise la production d'IL-12 (Messmer et al., 2006).

En outre, la colchicine marque un effet immunostimulant sur les cellules dendritiques DCs. Localement administrée, la colchicine induit la maturation et la migration *in situ* des

cellules dendritiques, et augmente les réponses immunitaires humorales et cellulaires (Mizumoto et al., 2005).

Chen et al. (2010) ont trouvé que la tetrandrine a atténué les réponses d'allo-immunisation médiées par les cellules dendritiques et a prolongé la survie de greffe de la peau chez la souris.

3.4.6. Effet sur les monocytes

Une étude a montré que la berberine inhibe *in vivo* l'expression de la protéine-1 chimiotactique (MCP-1) des monocytes induite par le LPS (Lipopolysaccharide), cette inhibition dépend de la dose de l'alcaloïde cité ci-dessus (Cui et al., 2007), aussi la berberine est impliquée dans l'inhibition de l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales (Wang et al., 2009).

Dans une autre étude, il a été remarqué que le *burst* oxydatif des monocytes humains cultivés et exposés aux alcaloïdes indoliques a été stimulé par la production de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et par conséquent l'activation de la fonction des monocytes (Keisari et al., 1985).

3.4.7. Effet sur les mastocytes

Nugroho et al. (2011), ont étudié l'effet de l'aegeline, un alcaloïde isolé d'*Aegle marmelos*, sur la sécrétion d'histamine par les mastocytes. Ils ont utilisé deux types de mastocytes du rat : les basophiles de la leucémie du rat (RBL-2H3), un analogue de tumeur des mastocytes et les mastocytes péritonéaux du rat (RPMC). Dans cette étude, l'albumine dinitrophénylée du sérum de boeuf (DNP₂₄-BSA), thapsigargine, ionomycine et acétate de myristate de phorbol (PMA) ont été employés comme inducteurs de la sécrétion d'histamine par les mastocytes.

L'aegeline a empêché la sécrétion d'histamine des cellules (RBL-2H3) induite par DNP₂₄-BSA, un antigène spécifique pour l'anticorps monoclonal d'IgE. En outre, cet alcaloïde a provoqué une forte inhibition des cellules RBL-2H3 induite par des stimulants de Ca^{+2} tels que thapsigargine et ionomycine. Par contre, il a montré une faible inhibition de la sécrétion d'histamine des RPMCs, mais cette inhibition semble être plus forte quand ces

cellules sont traitées par la thapsigargine. Ces résultats indiquent que l'aegeline a changé la voie de signalisation intracellulaire de Ca^{+2} induite par la thapsigargine.

Donc, les effets inhibiteurs de l'aegeline sur la sécrétion d'histamine par les mastocytes dépendaient du type de mastocytes et ils ont également impliqué quelques mécanismes liés à la signalisation intracellulaire du Ca^{+2} .

3.4.8. Effet sur les neutrophiles

Les radicaux de l'oxygène produits par les neutrophiles cytotoxiques, ont été impliqués dans la pathogénèse d'une variété de maladies cardiovasculaires et pulmonaires. Il a été démontré que la nicotine renforce la génération d'anion de superoxyde par les neutrophiles humains, et par conséquent augmente le risque des maladies (Jaya et al., 1986).

Environ 95% du venin importé par la fourmi du feu *Solenopsis invicta* se compose de pipéridines. Ces alcaloïdes produisent une pustule distincte à l'emplacement de l'injection. La formation de cette pustule peut impliquer l'activation des neutrophiles, voire des plaquettes. Ces résultats suggèrent que l'activation des neutrophiles par la pipéridine puisse se produire *in vivo* comme réponse aux piqûres par cette fourmi rouge du feu (Javors et al., 1993).

Welters et al. (2000) ont prouvé que la morphine inhibe la fonction des neutrophiles, *via* le sous-type de récepteur de l'opiacé μ_3 trouvé sur les immunocytes.

3.4.9. Effet sur les basophiles

Il est devenu évident que la protéine kinase C (PKC) est activée après l'exposition des basophiles à anti-IgE ayant pour résultat la phosphorylation consécutive de différentes protéines conduisant à l'activation des basophiles.

Amon & Dietz (1992) ont montré que l'alcaloïde staurosporine est un inhibiteur fort de la PKC, et donc inhibition de la sécrétion de médiateurs des basophiles périphériques humains *in vitro*, cette étude élucide la possibilité de l'utilisation de la staurosporine dans le traitement anti-allergique et anti-inflammatoire.

3.4.10. Effet sur les éosinophiles

Une étude a été réalisée sur l'effet thérapeutique du chlorhydrate d'azelastine (AZE) et de la biscoclaurine vis-à-vis du syndrome d'hyper-éosinophilie idiopathique (HES). Le chlorhydrate d'azelastine avec ou sans biscoclaurine peut réduire et maintenir le nombre des éosinophiles à un niveau normal (Tadaatsu et *al.*, 2004).

En outre, la warifteine, un alcaloïde isolé de la plante *Cissampelos sympodialis*, représente un composant actif responsable des effets anti-éosinophiliques en inhibant l'éosinophilie allergique (Bezerra et *al.*, 2006).

Deuxième partie
Etude expérimentale

1. Matériel et Méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel végétal et phytochimique

Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à l'extrait brut d'alcaloïdes isolé du Khat (*Catha edulis* Forsk.).

Le khat, ou qat, est une espèce d'arbuste de la famille des Celastracées, originaire d'Afrique orientale, mais dont la culture s'est également étendue à la péninsule arabe (surtout Yémen). Le khat est connu surtout pour son usage par les populations de ces régions qui en mâchent longuement les feuilles (Fig.23) pour leur effet stimulant et euphorisant comparable à celui de l'amphétamine (Iserin, 2001).

Les feuilles du khat ont été récoltées de l'Yémen, séchées puis broyées pour réaliser une extraction chloroformique des alcaloïdes totaux par des thésards Yéméniens appartenant au laboratoire de phytochimie du département de chimie université Mentouri de Constantine.

L'extrait brut obtenu, de couleur brune nous est parvenu pour étudier son activité immunologique.

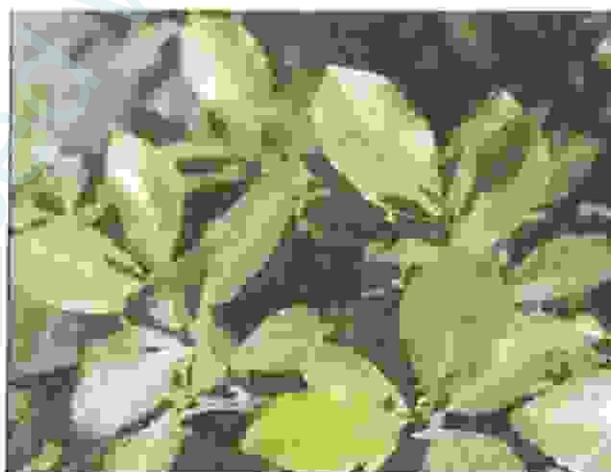


Fig.23 : Partie de la plante du khat (Lukandu, 2009).

1.1.2. Matériel biologique (modèle animal)

Le modèle animal est constitué de souris blanches de sexe masculin, de poids corporel de 24g à 30g, âgées plus de quatre semaines et acclimatées à l'animalerie de l'Institut Pasteur - Alger -.

L'espèce utilisée est de l'ordre des rongeurs et représente l'espèce des vertébrés la plus couramment utilisée comme un principal organisme modèle dans des différentes expérimentations et recherches scientifiques, ainsi que pour les tests comportementaux. Cette espèce est un mammifère populaire en raison de sa disponibilité, sa taille, facilité de manipulation, d'élevage et son taux de reproduction (Willis-Owen & Flint, 2006).

1.1.3. Conditions d'élevage

Les souris sont logées dans des cages en polypropylène (Fig.24), qui sont nettoyées régulièrement et changées chaque jour.

Elles sont élevées dans des conditions caractérisées par une température et une photopériode naturelle. Leur besoin alimentaire journalier est composé d'aliment riche en graine (blé, maïs, ...), du pain rassis et d'eau.



Fig.24 : Matériel biologique (souris blanches).

1.2. Méthodes

1.2.1. Protocole expérimental

Afin de réaliser la partie expérimentale de notre travail, nous avons établi un protocole que nous pouvons le résumer dans la figure 25.

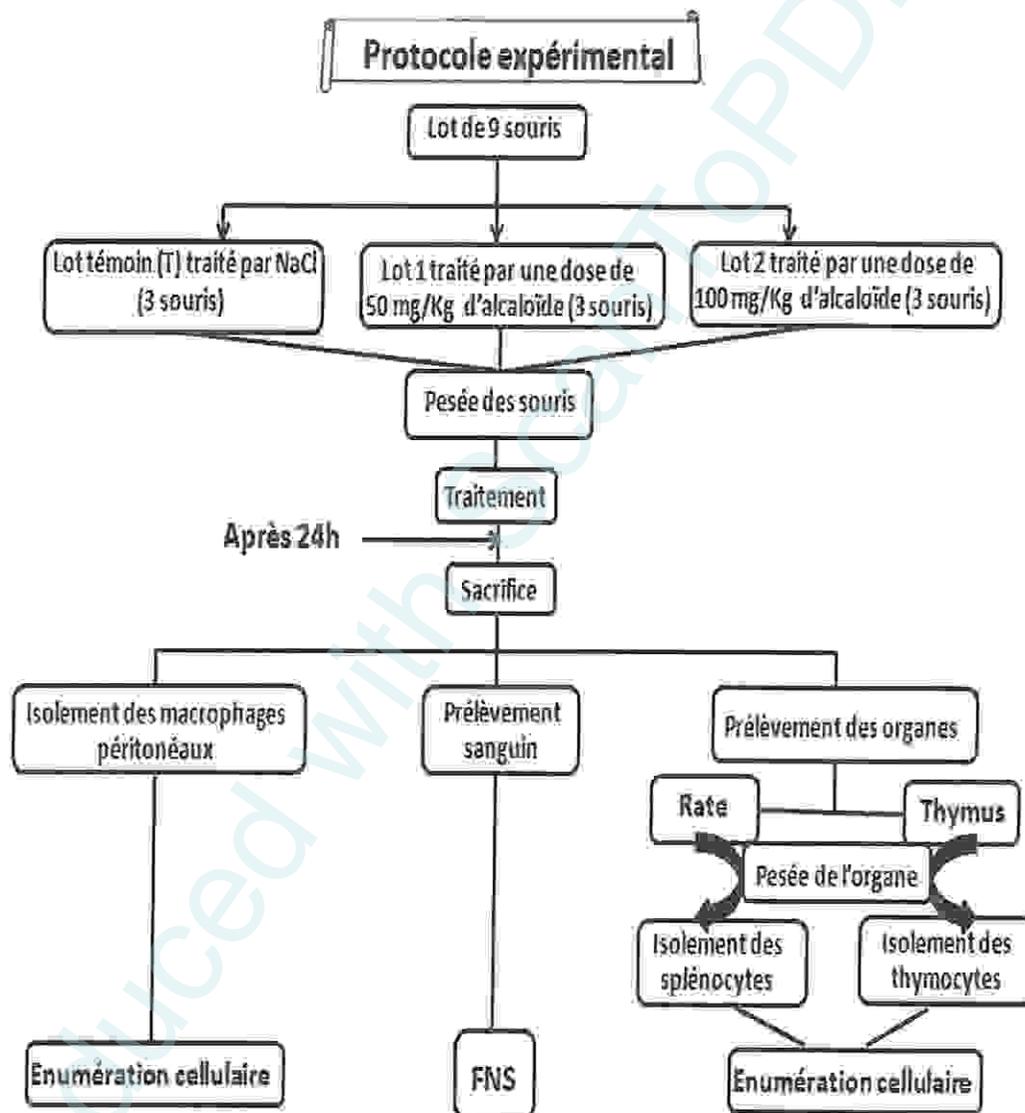


Fig.25 : Schéma représentatif du protocole expérimental.

1.2.2. Traitement

Le traitement consiste à administrer par voie intra-péritonéale et à l'aide de seringues à insuline l'extrait brut d'alcaloïdes isolé du khat. La quantité injectée dépend du poids corporel

de la souris et de la dose demandée. A cet effet, trois lots sont constitués et répartis comme suit :

- Lot T : traité seulement par le NaCl.
- Lot 1 : traité par une dose de 50 mg/Kg de poids corporel de la souris (voir annexe).
- Lot 2 : traité par une dose de 100 mg/Kg de poids corporel de la souris (voir annexe).

1.2.3. Prélèvement sanguin

Le prélèvement s'effectue après avoir égorgé l'animal. Le sang est recueilli dans des tubes à EDTA destiné pour la réalisation de la FNS (formule numérique sanguine).

1.2.4. Isolement des macrophages péritonéaux

Après avoir préparé la plaque à dissection et stérilisé la surface avec de l'alcool ainsi les instruments de dissection, la souris est fixée sur le dos avec des aiguilles. On ouvre la peau de la face ventrale (attention de ne pas ouvrir le péritoine à cette étape), et on l'écarte proprement pour découvrir les muscles péritonéaux (Fig.26).



Fig.26 : Le péritoine de la souris.

A l'aide d'une seringue stérile, 3ml de la solution de PBS (voir annexe) sont introduits dans la cavité péritonéale (Fig.27). Après 5 minutes, le liquide de lavage est récupéré dans un tube stérile et centrifugé 5 minutes à 1500 rpm.

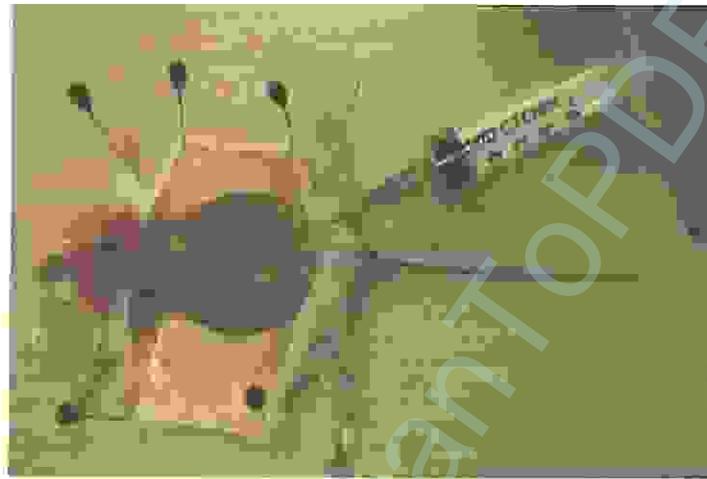


Fig.27 : Injection de PBS dans la cavité péritonéale.

Le culot issu de cette première centrifugation est remis en suspension dans 3ml de PBS et recentrifugé 5 minutes à 1500 rpm. (2 fois). A la fin du dernier lavage le culot est remis en suspension dans 3ml de PBS, à partir de laquelle 100µl sont dilués dans 900µl de bleu de trypan (voir annexe).

Enfin, on passe au comptage des macrophages péritonéaux des quatre coins de la cellule de Malassez et à déduire leur pourcentage de viabilité par le test (*trypan blue exclusion test*).

- Le nombre de macrophages péritonéaux par litre est calculé selon l'équation suivante:

$$N = (n/v) f$$

Avec:

N: Nombre de cellules par litre.

n : nombre de cellules comptées.

v: volume de comptage en litre.

f : facteur de dilution.

Notons que le facteur de dilution est égal à 30.

- Le pourcentage de viabilité est calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\text{Nombre total des cellules} - \text{Nombre de cellules mortes}}{\text{Nombre total des cellules}} \times 100$$

Sachons que les cellules mortes seront colorées en bleu.

1.2.5. Prélèvement des organes

Après sacrifice et dissection des animaux, la rate et le thymus sont prélevés et pesés à l'aide d'une balance de précision (Sartorius).

1.2.6. Isolement des splénocytes

Après avoir pesé la rate, cette dernière est déposée dans une boîte de pétri contenant 3ml de solution de PBS et est débarrassée de la graisse. A l'aide de deux pinces, la capsule est vidée de son contenu cellulaire (Fig.28).

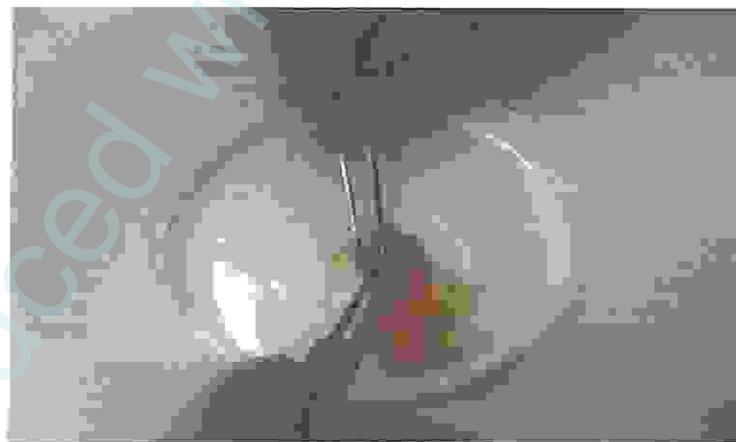


Fig.28 : La dilacération de la rate.

La suspension cellulaire est ensuite placée dans un tube après être filtrée sur une gaze fixée à un entonnoir puis centrifugée pendant 10 min. à 1500 rpm.

Le culot est remis en suspension dans 0.5ml de PBS, puis 4.5ml de solution de lyse des globules rouges (voir annexe) est ajoutée.

Après une incubation de 10 min, la suspension est centrifugée 10 min. à 1500 rpm. Cette dernière est suivie par l'élimination du surnageant alors que le culot est remis en suspension dans 3ml de PBS, centrifugé 10 min. à 1500 rpm. Cette dernière étape est répétée deux fois.

A la fin du dernier lavage, le culot cellulaire est repris dans 3ml de PBS et enfin l'énumération des splénocytes est réalisée après avoir dilué 100 μ l de la suspension cellulaire dans 900 μ l de bleu de trypan, ainsi le pourcentage de viabilité de ce type cellulaire est calculé.

1.2.9. Isolement des thymocytes

Après avoir pesé le thymus, ce dernier est déposé dans une boîte de pétri contenant 3ml de solution de PBS et est débarrassé de la graisse, à l'aide de deux pinces (**Fig.29**).

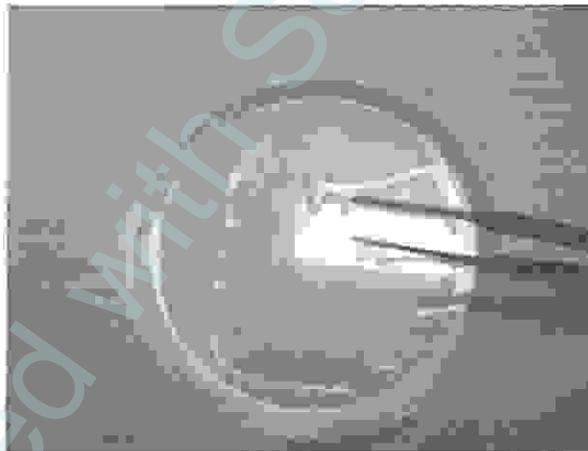


Fig.29 : La dilacération du thymus.

La suspension cellulaire est ensuite placée dans un tube polycarbonaté après être filtrée sur une gaze fixée à un entonnoir puis centrifugée pendant 10 min. à 1500 rpm.

Le culot est remis en suspension dans 3ml de PBS, puis la suspension est centrifugée 10 min. à 1500 rpm. Cette dernière est suivie par l'élimination du surnageant alors que le culot est remis en suspension dans 3ml de PBS, centrifugé 10 min. à 1500 rpm.

A la fin du dernier lavage, le culot cellulaire est repris dans 3ml de PBS et enfin l'énumération des thymocytes est réalisée après avoir dilué 100 μ l de la suspension cellulaire dans 900 μ l de bleu de trypan, ainsi le pourcentage de viabilité de ce type cellulaire est calculé.

Produced with ScanTOPDF

2. Résultats et discussion

2.1. Variation du poids du thymus et de la rate

Après 24 h de traitement, suivi d'un sacrifice de l'animal, le thymus et la rate ont été pesés. Une différence de poids de ces organes a été constatée chez les souris témoins et les souris traitées.

Concernant la rate, les résultats représentés ci-dessous (Fig.30) révèlent une augmentation plus ou moins remarquable : lot témoin (T) : 0.104 ± 0.01 g, Lot1 traité (50 mg/kg) : 0.132 ± 0.04 g et Lot2 traité (100 mg/kg) : 0.146 ± 0.02 g.

Par contre, pour le thymus, l'augmentation du poids enregistrée était légère par rapport au témoin (T: 0.048 ± 0.006 g ; Lot1 : 0.054 ± 0.008 g et Lot2 : 0.051 ± 0.01 g) (Fig.30).

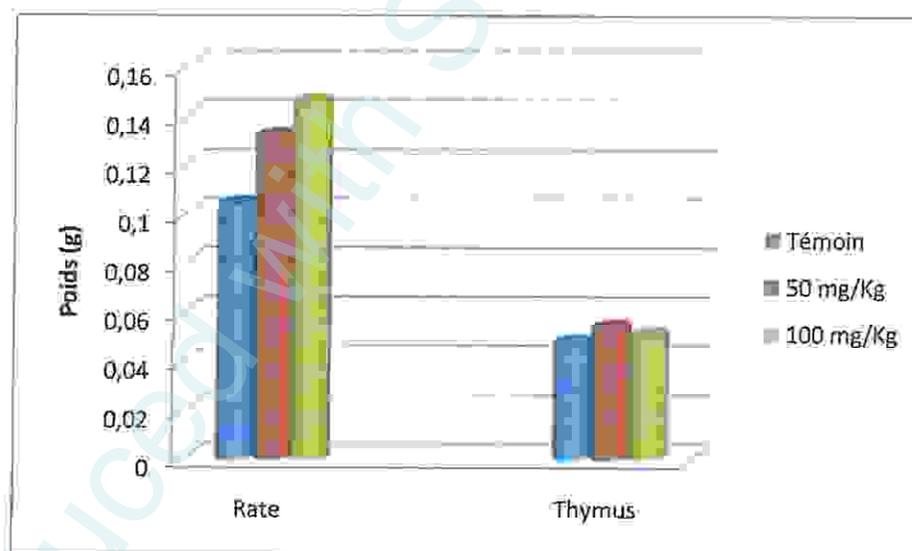


Fig.30 : Variation du poids de la rate et du thymus entre témoins et traitées.

2.2. Variation du nombre des splénocytes et thymocytes

L'énumération des splénocytes et thymocytes révèle des résultats conformes aux variations du poids de la rate et du thymus.

Concernant les splénocytes, on a remarqué qu'il y a une augmentation importante par rapport au témoin à chaque fois que la dose augmente (T : $39 \pm 13.24 \times 10^9$ cell/L ; Lot1 : $45 \pm 3.7 \times 10^9$ cell/L et Lot2 : $61.5 \pm 13.70 \times 10^9$ cell/L) (Fig.31).

Pour le nombre des thymocytes, les résultats ont montré une légère augmentation surtout dans le lot traité par 50 mg/Kg (T : $40.5 \pm 9.6 \times 10^9$ cell/L ; Lot1 : $42 \pm 15.37 \times 10^9$ cell/L et Lot2 : $40.75 \pm 14.08 \times 10^9$ cell/L) (Fig.31).

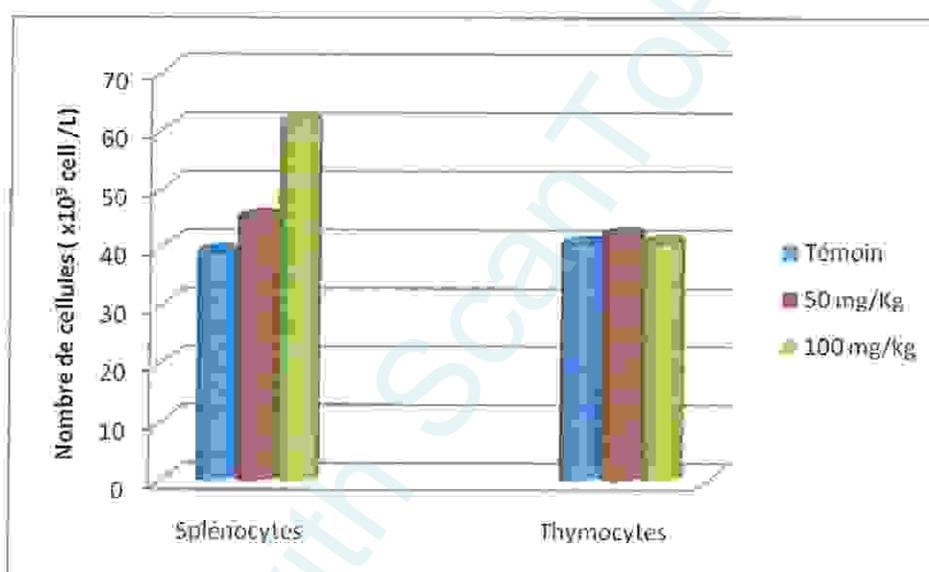


Fig.31 : Variation du nombre des splénocytes et thymocytes entre témoins et traitées.

L'augmentation du nombre de splénocytes et de thymocytes est parallèle à celle du poids des organes lymphoïdes relatifs, cela peut être due d'une part, à la migration de lymphocytes du sang vers ces organes et d'autre part, à l'effet stimulant des alcaloïdes.

Ce résultat se coïncide avec l'étude de Manu & Kuttan (2009) qui ont étudié l'effet de la punarnavine, un alcaloïde extrait de *Boerhaavia diffusa*, sur la réponse immunitaire basée sur les lymphocytes.

2.3. Variation du nombre des macrophages péritonéaux

Le résultat illustré par la Figure 32, décrit la progression du nombre des macrophages par rapport au témoin, et cette progression demeure claire chez les souris traitées par la dose 100 mg/Kg malgré la légère différence remarquée entre les deux lots traités (T : $30.75 \pm 9.65 \times 10^9$ cell/L ; Lot1 : $38.25 \pm 8.63 \times 10^9$ cell/L et Lot2 : $39 \pm 14.2 \times 10^9$ cell/L).

Cette augmentation peut être expliquée par la migration des monocytes du sang vers les tissus afin de se transformer en macrophages.

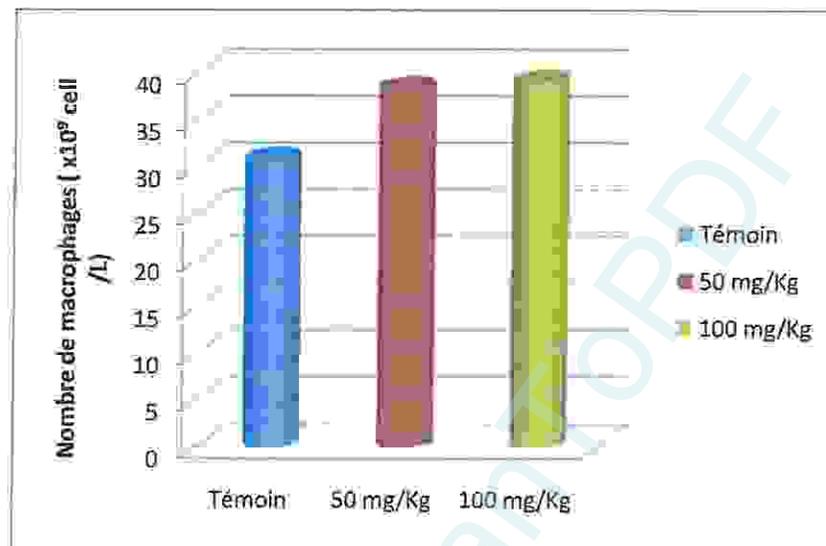


Fig.32 : Variation du nombre des macrophages péritonéaux entre témoins et traitées:

Ce résultat obtenu se coïncide avec les travaux déjà mentionnés en troisième chapitre, et qui ont montré que la berberine et les alcaloïdes d'oxindoles pentacycliques (POA) extraits d'*Uncaria tomentosa* ont un effet activateur et stimulant sur les macrophages (Kang et al., 2002 ; Keplinger et al., 1999).

2.4. Effet des alcaloïdes sur la formule leucocytaire

2.4.1. Variation du nombre des globules blancs, des lymphocytes et des monocytes

Les souris ayant subi un traitement par les différentes doses des alcaloïdes, ont montré une diminution remarquable du nombre des globules blancs (T: $8.14 \pm 1.37 \times 10^3$ cell/ μ L ; Lot1 : $7.07 \pm 0.75 \times 10^3$ cell/ μ L et Lot2 : $6.42 \pm 1.42 \times 10^3$ cell/ μ L) (Fig.33).

Le même résultat a été remarqué pour les lymphocytes (T: $6.75 \pm 0.5 \times 10^3$ cell/ μ L ; Lot1 : $6.38 \pm 0.45 \times 10^3$ cell/ μ L et Lot2 : $5.63 \pm 1.44 \times 10^3$ cell/ μ L) (Fig.34).

Par contre, une augmentation importante des monocytes notamment au niveau du lot1 (50 mg/kg) a été remarquée. Le nombre de ces cellules reste plus abondant chez les souris traitées par la dose de 100 mg/Kg par rapport aux témoins mais cette augmentation est moins

remarquable en la comparant avec celle de la dose précédente (T: $0.033 \pm 0.017 \times 10^3$ cell/ μ L ; Lot1 : $0.09 \pm 0.1 \times 10^3$ cell/ μ L et Lot2 : $0.056 \pm 0.034 \times 10^3$ cell/ μ L) (Fig.35).

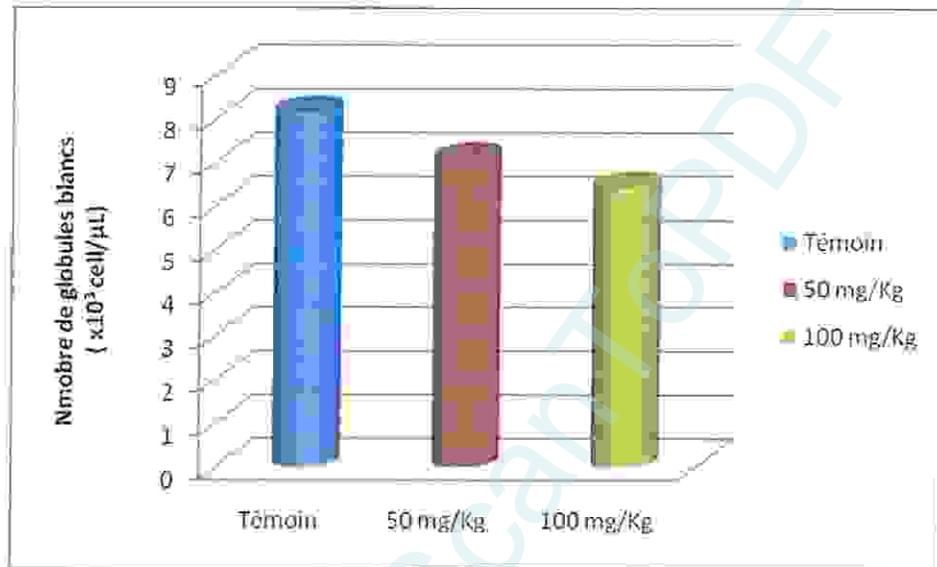


Fig.33 : Variation du nombre des globules blancs entre les témoins et traités.

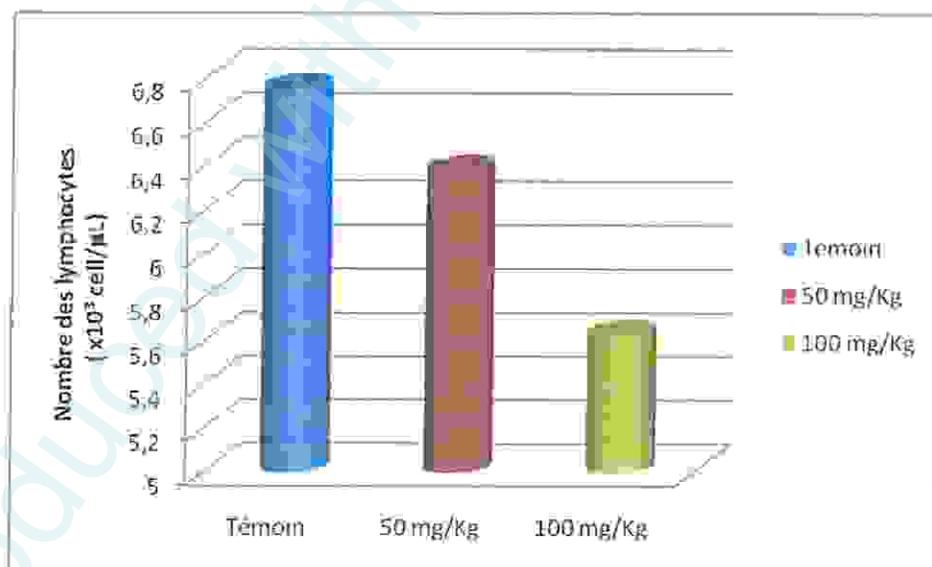


Fig.34 : Variation du nombre des lymphocytes entre les témoins et traités.

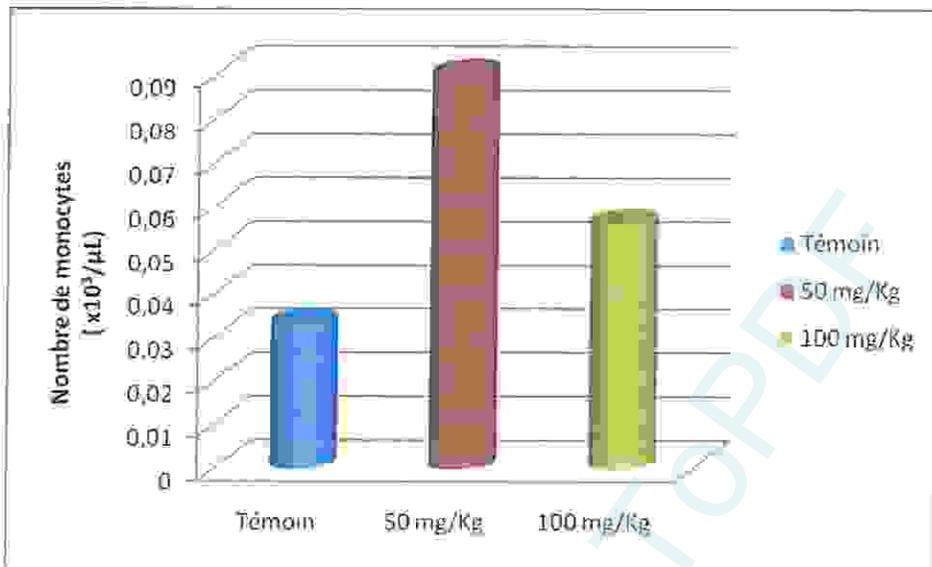


Fig.35 : Variation du nombre des monocytes entre les témoins et traités.

La diminution du nombre des globules blancs dans le sang peut être due à la diminution des lymphocytes circulants et pas aux granulocytes. On peut expliquer ce phénomène par l'effet inhibiteur sélectif de la production de ces cellules à partir des organes centraux ou de leur prolifération. Cela se coïncide avec l'étude qui a suggéré que la berberine inhibe l'expression des antigènes activant les lymphocytes et bloque la progression du cycle cellulaire de ces derniers (Xu et al., 2005).

Ce résultat est accordé aussi avec l'étude de Noble (1990), qui a indiqué que le nombre des globules blancs est fortement affecté après un traitement par des alcaloïdes extraits de *vinca*, et par conséquent leur dépression. Ce chercheur a suggéré d'utiliser l'extrait de *vinca* dans le traitement des lymphomes ou des leucémies.

Egalement, nos résultats marquent un accord avec l'étude de Morkawa et ses collaborateurs (1993), qui ont pu mettre en évidence que la bromocriptine a un effet immunosuppresseur sur la prolifération des lymphocytes B.

En outre, on a signalé une augmentation du poids des organes lymphoïdes, ce qui confirme l'hypothèse de migration des lymphocytes du sang vers ceux-ci.

En ce qui concerne l'augmentation du nombre des monocytes, les expérimentations antérieures ont démontré que l'exposition des monocytes aux alcaloïdes indoliques stimule la production de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et par conséquent l'activation de la fonction des monocytes (Keisari et al., 1985).

2.4.2. Variation du nombre des granulocytes

Les résultats représentés dans la Figure 36, décrivent les variations du nombre des granulocytes entre les témoins et les traitées.

Une augmentation du nombre des neutrophiles a été observée chez les souris traitées par rapport aux souris témoins (T : $0.435 \pm 0.005 \times 10^3$ cell/ μ L ; Lot1 : $0.59 \pm 0.2 \times 10^3$ cell/ μ L et Lot2 : $0.73 \pm 0.1 \times 10^3$ cell/ μ L).

Par contre, le nombre des éosinophiles ainsi que celui des basophiles a diminué (T : $0.01 \pm 0.008 \times 10^3$ cell/ μ L ; Lot1 : $0.003 \pm 0.004 \times 10^3$ cell/ μ L et Lot2 : $0.003 \pm 0.004 \times 10^3$ cell/ μ L).

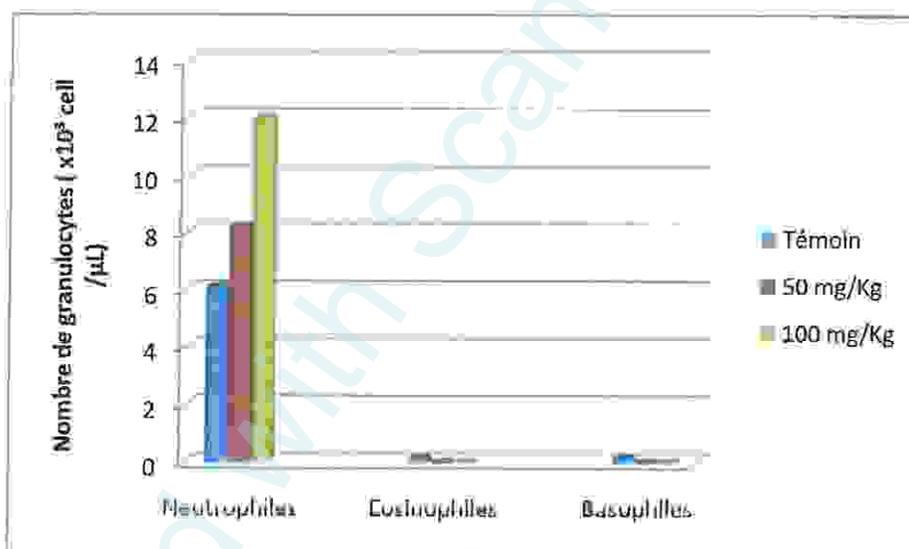


Fig.36 : Variation du nombre des granulocytes entre témoins et traitées.

L'augmentation remarquable du nombre des neutrophiles se coïncide avec l'étude suggérant que la pipéridine extrait de venin de fourmi du feu *Solenopsis invicta*, active les neutrophiles *in vivo* comme une réponse aux piqûres par cette fourmi (Javors et al., 1993).

Quant aux variations du nombre des basophiles et des éosinophiles, les résultats obtenus s'accordent avec ceux trouvés et cités en troisième chapitre indiquant que l'alcaloïde isolé de la plante *Cissampelos sympodialis*, la warifteine, représente un composant actif responsable des effets anti-éosinophiliques et inhibe l'éosinophilie allergique (Bezerra et al., 2006). D'autre part, une autre étude a démontré que l'alcaloïde staurosporine

est un inhibiteur fort de la protéine kinase C (PKC) et par conséquent, l'inhibition de la sécrétion de médiateurs des basophiles (Amon & Dietz, 1992).

Etant donné que le nombre des granulocytes a enregistré en général une hausse, malgré la baisse du nombre des basophiles et des éosinophiles, on peut accorder cette augmentation à l'augmentation des neutrophiles. Cette suggestion peut être expliquée et fondée par les résultats des travaux de l'équipe de Nowakowska qui ont indiqué que les alcaloïdes d'oxindoles pentacycliques (POA) extraits d'*Uncaria tomentosa* sont capables d'augmenter le taux de phagocytes, y compris les granulocytes (Nowakowska et al., 2010).

Une étude a confirmé aussi, que la colchicine exerce une fonction anti-chimiotactique des neutrophiles et inhibe la migration des granulocytes vers les zones inflammatoires, ce qui conduit à leur augmentation dans le sang (Altindag et al., 1996).

3. Conclusion et perspectives

Au cours de notre présent travail, nous avons étudié l'extrait brut des alcaloïdes isolé des feuilles de *Catha edulis* Forsk. (khat), une plante très connue dans la péninsule arabe (surtout Yémen).

Les alcaloïdes font l'objet de plusieurs travaux publiés dans des revues spécialisées. Pour notre part, nous avons tenté de contribuer à leur valorisation en cherchant une relation entre ces composés et les éléments du système immunitaire, à travers leurs effets immunostimulants.

Les résultats obtenus des tests réalisés *in vivo*, ont mis en évidence une augmentation du nombre de splénocytes et thymocytes en parallèle avec leurs organes lymphoïdes relatifs ainsi que pour le taux des macrophages péritonéaux, cette augmentation peut être due à la migration de lymphocytes du sang vers ces sites, ce qui pourrait expliquer leur diminution avec les globules blancs.

En outre, une augmentation a été remarquée pour les granulocytes surtout les neutrophiles et monocytes circulants, cela peut être due à l'effet activant de ces alcaloïdes.

Sur la base de nos résultats et de ce que nous avons trouvé dans la documentation, nous pourrions confirmer que ces alcaloïdes exercent un effet stimulant notamment sur les effecteurs de la réponse immunitaire innée.

Nous sommes néanmoins persuadé que cette étude mérite d'être poursuivie. Cela permettra sans doute de progresser dans le difficile accès de ce nouveau champ de connaissance situé à l'interface de l'immunologie et la phytochimie. Il serait souhaitable :

- De chercher l'effet de cet extrait sur les différents effecteurs de la réponse innée tels que les cytokines et d'autres facteurs solubles.
- D'étudier l'effet direct sur les cellules responsables de la réponse inflammatoire en se basant sur des tests *in vitro*.
- De réaliser une purification de cet extrait afin de chercher le principe actif de cette plante et d'étudier son activité anti-inflammatoire, par le fait que nous avons signalé que l'extrait entier pourrait avoir cette activité.

Références bibliographiques

- Altındag ZZ., Werner FG., Sahin G., Wachter H. & Fuchs D. (1997).** Colchicine derivatives inhibit noepeterin production in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Clin. Exp. Immunol.* 107, 574-577.
- Amon U. & Dietz KR. (1992).** Protein kinase C : A target for anti-inflammatory therapy ?. *Arch. Dermatol. Res.* 284 (1), 8-10.
- Aniszewski T. (2007).** Alkaloids - secrets of life : alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. 1^{ère} édition, *Elsevier*. Hollande. 335 p.
- Bezerra-Santos CR., Vieira AA., Barbosa-Filho JM., BandeiraMelo C., Pinvezam MR. & Bozza PT. (2006).** Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid wariffeine. *Int Immunopharmacol.* 6 (7), 1152-1160.
- Bouclé S. (2010).** Synthèse d'analogues d'alkaloïdes marins à potentiel anti-tumoral. Thèse de doctorat en Chimie Organique, Université François - Rabelais de tours, France. 323p.
- Brunton J. (1993).** Pharmacognosis, Phytochimie, Plantes médicinales. 2^{ème} édition, *Tec & Doc - Lavoisier*, Paris, 402p.
- Canu A., Peter F. (2001).** Le préparateur en pharmacie, Dossier 4 : Microbiologie - Immunologie. *TÉC & DOC*, Paris. 115p.
- Castranova V., Kang JH., Ma JK., Mo CG., Malanga CJ., Moore MD., Schwegler-Berry D. & Ma JY. (1991).** Effects of bisbenzylisoquinoline alkaloids on alveolar macrophages : correlation between binding affinity, inhibitory potency, and anti.brotic potential. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108 (2), 242-252.
- Catier O. & Roux D. (2007),** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3eme édition, *Wolters Kluwer*. France. 141p.

Chen JJ., Luo YT., Hwang TL., Sung PJ., Wang TC. & Chen IS. (2008). A new indole alkaloid and anti-inflammatory constituents from *Strychnos cathayensis*. *Chem. Biodivers.* 5, 1345-1352.

Chen JJ., Chung CY., Hwang TL. & Chen JF. (2009). Amides and benzenoids from *Zanthoxylum ailanthoides* with inhibitory activity on superoxide generation and elastase release by neutrophils. *J. Nat. Prod.* 72, 107-111.

Chen Y., Lai HS., Chiang BL., Tseng SH. & Chen WJ. (2010). Tetrandrine attenuated dendritic cell-mediated alloimmune responses and prolonged graft survival in mice. *Planta Med.* 76, 1424-1430.

Chuchawankul S., Khorana N. & Poovorawan Y. (2012). Piperine inhibits cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Genetics and Molecular Research*, 11 (1), 617-627.

Cui HS., Hayasaka S., Zheng LS., Hayasaka Y., Zhang XY. & Chi ZL. (2007). Effect of Berberine on Monocyte Chemotactic Protein-1 and Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1 Expression in Rat Lipopolysaccharide-Induced Uveitis. *Ophthalmic Res.* 39, 32-39.

Danoun G. (2010). Développement de nouvelles stratégies de synthèses d'alcaloïdes basées sur la métathèse d'oléfines hétérosubstituées. Synthèse de la (+)-castanospermine et de la (+)-1-désoxyojirimycine. Thèse de doctorat en Chimie Organique, Université de Grenoble, France, 207p.

Delorenzi JC., Freire-de-Lima L., Gattass CR., Costa DA., He L., Kuehne ME. & Saraiva EMB. (2002). In Vitro Activities of Iboga Alkaloid Congeners Coronaridine and 18-Methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. agents and chemother.* 46 (7), 2111-2115.

Donatien K. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction, identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat en Chimie organique, Faculté des Sciences et Techniques de Bamako, Mali. 188p.

Espinosa E. & Chillet P. (2006). *Immunologie*. Ellipses, Paris. 432p.

Fiserová A., Kovárů H., Hajduová Z., Mares V., Starec M., Kren V., Flieger M. & Pospisil. (1997). Neuroimmunomodulation of natural killer (NK) cells by ergot alkaloid derivatives. *Physiol. Res.* 46 (2), 119-125.

Fofana S. (2004). Exploration biochimique sur le pouvoir immunogène de trois plantes en côte d'ivoire : *Alstonia boonell* (Apocynaceae), *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae) et *Terminalia catappa* (Combretaceae). Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Bamako, Mali. 123p.

Galustian C., Foulds S., Dye JF. & Guillou PJ. (1994). Swainsonine, a glycosylation inhibitor, enhances both lymphocyte efficacy and tumoursusceptibility in LAK and NK cytotoxicity. *Immunopharmacology*, 27 (2), 165-172.

Häkkinen ST. (2008). A functional genomics approach to the study of alkaloid biosynthesis and metabolism in *Nicotiana tabacum* and *Hyoscyamus muticus* cell cultures. *VTT-PUBS-696*, 90p.

Hamsa TP. & Kuttan G. (2011). Augmentation of cellular immune response by *Ipomoea obscura* and *Ipobscurine* alkaloid attenuates tumor growth in mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 89 (4), 259-268.

Hess M. (2002). Alkaloids, Nature's Curse or Blessing; 1^{ère} édition, *Wiley-VCH*. New York.

Humphries MJ., Matsumoto K., White SL., Molyneux R.I. & Olden K. (1988). Augmentation of Murine Natural Killer Cell Activity by Swainsonine, a New Antimetastatic Immunomodulator. *CANCER RESEARCH*, 48, 1410-1415.

Iserin P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, Préparations, soins. *Larousse*. Paris. 335p.

Javors MA., Zhou W., Maas JW., Han S. & Keenan RW. (1993). Effects of fire ant venom alkaloids on platelet and neutrophil function. *Life Sciences*. 53 (14), 1105-1112.

Jaya M., Kojima S. & Gillespie MN. (1986). Nicotine potentiates superoxide anion generation by human neutrophils. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 86 (3), 484-487.

Jim HZ., Lee JH., Lee D., Lee HS., Hong YS., Kim YH. & Lee JJ. (2004). Quinolone Alkaloids with Inhibitory Activity against Nuclear Factor of Activated T Cells from the Fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (6), 926-928.

- Kang BY., Chung SW., Cho D. & Kim TS. (2002).** Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the induction of interleukin-12 p40 production in mouse macrophages by berberine, a benzodioxoloquinolizine alkaloid. *Biochem Pharmacol.* 63, 1901-1910.
- Keisari Y., Geya I., Flescher E., Goldin H. & Lavie G. (1985).** Stimulation of human monocyte oxidative burst and related cytotoxicity by tumor-promoting and non-tumor promoting diterpene esters, indole alkaloids and polyacetate-type agents. *Int. J. Cancer.* 36 : 467-472.
- Keplinger K., Laus G., Wurm M., Dierich MP. & Teppner H. (1999).** *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.-Ethnomedicinal use and pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology.* 64, 23-34.
- Lai JH., Ho LJ., Kwan CY., Chang DM. & Lee TC. (1999).** Plant alkaloid tetrandrine and its analog block CD28-costimulated activities of human peripheral blood T cells : potential immunosuppressants in transplantation immunology. *Transplantation.* 68.(9), 1383-1392.
- Lee DU., Kang YJ., Park MK., Lee YS., Seo HG., Kim TS., Kim CH. & Chang KC. (2003).** Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF α , iNOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. *Life Sciences.* 73 (11), 1401-1412.
- Lukandu OM. (2009).** Toxicity of Khat on Normal Human Oral Cells . In Vitro Studies Using Primary Human Oral Keratinocytes and Fibroblasts in Monolayer and Organotypic Cultures. Thèse de doctorat, université de Bergen, 76 p.
- Luo Y., Liu M., Xia Y., Dai Y., Chou G. & Wang Z. (2010).** Therapeutic effect of norisoboldine, an alkaloid isolated from *Radix Linderae*, on collagen-induced arthritis in mice. *Phytomedicine.* 17 (10), 726-731.
- Magarinos CJ., Giménez A., Blomberg TM. & Fernández C. (2009).** An alkaloid extract of *Evantia*, traditionally used as anti-*Leishmania* agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-gamma production in polyclonally activated cells. *Scand J Immunol.* 69 (3), 251-258.

- Manu KA., Kuttan G. (2007).** Effect of punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa*, on cell-mediated immune responses and TIMP-in B16F-10 metastatic melanoma bearing mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 29, 569-586.
- Manu KA., Kuttan G. (2009).** Immunomodulatory activities of Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 31(3): 377-387.
- Mauro NM. (2006).** Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs : la anatoxine-a et la camptothécine. Thèse de doctorat en chimie. Université de Joseph Fourier - Grenoble. France. 194p.
- Messmer D., Hatsukari I., Hitosugi N., Schmidt WI. & Singhal PC. (2006).** Morphine reciprocally regulates IL-10 and IL-12 production by monocyte-derived human dendritic cells and enhances T cell activation. *Mol. Med.* 12 (11.12) : 284-290.
- Middlebrook AJ., Martina C., Chang Y., Lukas RJ. & De Luca D. (2002).** Effects of Nicotine Exposure on T Cell Development in Fetal Thymus Organ Culture : Arrest of T Cell Maturation. *J Immunol.* 169, 2915-2924.
- Mizumoto N., Gao J., Matsushima H., Ogawa Y., Tanaka H. & Taka-shima A. (2005).** Discovery of novel immunostimulants by dendritic-cell. based functional screening. *BLOOD.* 106 (9), 3082-3089.
- Markawa K., Oseko F. & Morikawa S (1993).** Immunosuppressive property of bromocriptine on human B lymphocyte function in vitro. *Clin Exp Immunol.* 93, 200-205.
- Noble RL. (1990).** The discovery of the vinca alkaloids--chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol.* 68 (12), 1344-1351.
- Nokta M., Albrecht T. & Pollard R. (1993).** Papaverine hydrochloride : effects on HIV replication and T-lymphocyte cell function. *Immunopharmacology.* 26 (2), 181-185.
- Nowakowska J., Sommer E., Czubaj A., Kuraś M., Skopińska RE. (2010).** Experimental immunology: the *in vitro* effect of *Uncaria tomentosa* water and ethanol extract on the metabolic activity of blood granulocytes in mice. *Centr. Eur. J. Immunol.* 35 (2), 69-72.

- Nugroho AE., Riyanto S., Sulhari MA. & Maeyama K. (2011).** Effects of aegeline, a main alkaloid of *Aegle marmelos* correa leaves, on the histamine release from mast cells. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 24 (3), 359-367.
- Parham P. (2003).** Le système immunitaire. *De Boek*. Paris. 407p.
- Patil AD., Kumar NV., Kokke WC., Bean MF., Freyer AJ., De Brosse C., Mai S., Trunch A., Carte B., Breen AL., Hertzberg RP., Johnson RK., Westly JW. & Potts BCM. (1995).** Novel Alkaloids from the Sponge *Batzella* sp. : Inhibitors of HIV gp120-Human CD4 Binding. *J. Org. Chem.*, 60 (5), 1182-1188.
- Seow WK., Nakamura K., Sugimura Y., Sugimoto Y., Yamada Y., Fairlie DP. & Thong YH. (1993).** Inhibitory effects of bisbenzylisoquinolines on synthesis of the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Mediators of Inflammation*, 2, 199-203.
- Souto AL., Tavares JF., da Silva MS., Diniz FM., Athayde-Filho PF. & Filho JMB. (2011).** Antiflammatory Activity of Alkaloids : An Update from 2000 to 2010. *Molecules*, 16, 8515-8534.
- Tadaatsu I., Takuya H. & Shigeru I. (2004).** Treatment of idiopathic hypereosinophilic syndrome with azelastine hydrochloride and biscoclairine alkaloids. *Allergology International*, 53 :379-382.
- Teh BS., Seow WK., Li SY., Thong YH. (1990).** Inhibition of prostaglandin and leukotriene generation by the plant alkaloids tetrandrine and berbamine. *Int. J. Immunopharmac.*, 12, 321-326.
- Titus RG. (1991).** Colchicine is a potent adjuvant for eliciting T cell responses. *The Journal of Immunology*, 146 (12), 4115-4119.
- Vernex LC. (2011).** Les possibilités de la phytothérapie en gériatrie caninine, Thèse de doctorat en Médecine - Pharmacie, Université de Claude-Bernard - Lyon I, France. 176p.
- Wang Y., Huang Y., Lam KSL., Li Y., Wong WT., Ye H., Lau CW., Vanhoutte PM. & Xu A. (2009).** Berberine prevents hyperglycemia-induced endothelial injury and enhances

vasodilatation via adenosin monophosphate-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovascular Research*. 82, 484-492.

Welters ID., Menzebacha A., Goumonb Y., Langefelda TW., Teschemachere H., Hempelmann G. & Stefanob GB. (2000). Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and $\mu 3$ opiate receptor-dependent mechanism. *Journal of Neuroimmunology*. 111 (1-2), 139-145.

Willis-Owen SA. & Flint J. (2006). La base génétique du comportement émotionnel chez la souris. *Eur. J. Hum. Genet.* 14 (6), 721-728.

Xu L., Liu Y. & He X. (2005). Inhibitory effects of berberine on the activation and cell cycle progression of human peripheral lymphocytes. *Cell Mol Immunol.* 2 (4), 295-300.

Younos A., Rolland A., Fleurentin j., Lanhers MC., Misslin R. & Mortier F. (1990). Analgesic and behavioral effects of morinda citrifolia. *Planta medica.* 56, 430-434.

Résumé

Les alcaloïdes forment un groupe fascinant de produits naturels et constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires des plantes qui jouent un rôle dans la défense contre les herbivores.

En raison de leur diversité structurale et de leurs propriétés biologiques variées, ces composés trouvent leur place dans les utilisations thérapeutiques et applications pharmaceutiques chez l'homme.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés dans notre travail à l'extrait brut d'alcaloïdes isolé des feuilles du khat (*Catha edulis* Forsk) récoltées de l'Yémen, pour étudier leurs effets sur certains éléments du système immunitaire.

Afin de pouvoir déterminer ces effets, deux doses de l'extrait brut d'alcaloïdes de khat (50 mg/kg et 100 mg/kg du poids corporel des souris) ont été administrées par voie intrapéritonéale et le nombre de certaines cellules immunitaires a été évalué.

Les résultats obtenus après 24 heures de traitement, ont mis en évidence une augmentation des splénocytes, thymocytes (en parallèle avec le poids des organes lymphoïdes relatifs), macrophages péritonéaux, granulocytes et monocytes circulants. Par contre une diminution a été signalée au niveau du taux global de globules blancs et de lymphocytes. Cela nous a conduits à penser que ces alcaloïdes exercent un effet stimulant notamment sur les effecteurs de la réponse immunitaire innée.

Mots clés : Alcaloïdes, système immunitaire, effet immunostimulant.

Abstract

The alkaloids form a fascinating group of natural products and constitute one of the greatest groups of secondary metabolites of the plants which play a role in defense against the herbivores.

Because of their structural diversity and their varied biological properties, these compounds find their place in the therapeutic uses and pharmaceutical applications for the man.

In this context, we were interested in our work in the rough alkaloid extract isolated from leaves of the khat (*Catha edulis* Forsk) collected of Yemen, to study their effects on certain elements of the immune system.

In order to be able to determine these effects, two amounts of the rough alkaloid extract of khat (50 mg/kg and 100 mg/kg of the body weight of the mice) were administered intra-peritoneally and the number of certain immune cells was evaluated.

The results obtained after 24 hours of treatment, showed an increase in the splenocytes, thymocytes (in parallel with relative organ weights of lymphoid organs), peritoneal macrophages, granulocytes and monocytes circulating. On the other hand, a reduction level of the total rate of white blood and lymphocytes level was unregistered. That led us to think that these alkaloids mainly exert a stimulating effect on the effectors of the innate immune.

Keywords : Alkaloids, immune system, immunostimulant effect.

ملخص

تشكل القلويدات مجموعة هامة من المنتجات الطبيعية، فهي واحدة من أكبر المستقلبات الثانوية عند النباتات التي تلعب دورا في الدفاع ضد الحشرات. و نظرا لتنوع بنيتها وخواصها البيولوجية، فهي تستعمل في العلاج ولها تطبيقات صيدلانية.

وبناء عليه فقد توجه اهتمامنا إلى دراسة مستخلص القلويدات الخام المستخرج من أوراق نبات القات الذي تم جمعه من اليمن، و ذلك من أجل معرفة تأثيره على عناصر الجهاز المناعي.

ولمعرفة هذا التأثير تم اختبار جرعتين من مستخلص القلويدات (50 مغ/كغ و 100 مغ/كغ من وزن جسم الفئران) وذلك بالحقن داخل الصفاق ثم تحديد عدد الخلايا المناعية.

سجلت النتائج المتحصل عليها بعد 24 ساعة من المعاملة، زيادة في الخلايا الطحالية، خلايا الغدة السعترية (و هذا بالتوازي مع وزن أعضائها اللمفاوية)، البالعات الكبيرة، و حيدات النوى والخلايا المحببة. و في المقابل لوحظ نقص في مستوى الكريات الدموية البيضاء واللمفاويات الدموية. و عليه نعتقد أن للقلويدات تأثير في تحفيز الاستجابة المناعية و بالأخص اللانوعية.

الكلمات المفتاحية : القلويدات، الجهاز المناعي، التأثير المنبه للمناعة.

Solution utilisées

Les Solutions mères

50 mg/Kg

Alcaloïdes 5 mg

NaCl 2 ml

Dissoudre 5 mg de l'extrait brut d'alcaloïdes dans quelques gouttes d'éthanol 95% puis ajouter la solution de NaCl.

100 mg/kg

Alcaloïdes 10 mg

NaCl 2 ml

Dissoudre 10 mg de l'extrait brut d'alcaloïdes dans quelques gouttes d'éthanol 95% puis ajouter la solution de NaCl.

Solution de NaCl (0.9%)

NaCl 2,25 g

Eau distillé 250 ml

Solution de PBS PH=7.2

Na Cl 8 g

Na₂HPO₄ 1.15 gKH₂PO₄ 0.2 g

K Cl 0.2 g

Eau distillée 1000 ml

Solution de lyse

NH ₄ Cl	0.83 g
Eau distillée	100 ml

H Cl 0.1 Normalité

H Cl	0.93 ml
Eau distillée	90.7 ml

Na OH 0.1 Normalité

Na OH	0.4 g
Eau distillée	100 ml

Bleu de trypan

Bleu de trypan	0.2g
Eau distillée	100 ml

Produced with ScanTOPDF