

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé :

Contribution à l'étude de l'activité immunomodulatrice de la
plante médicinale *vitex agnus Castus*

Présenté Par : CHAREF Amira
DJEKRIF Douaa
FRIGA Fatima

Membre de Jury:

Pr. SLIMANI souheila	Président	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Dr. BELAMBRI SAHRA Amel	Promoteur	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Dr. KHADRI sihem	Examineur	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

Remercîment

Avant tout, on remercie Allah le tout puissant de nous avoir donnée le courage, la patience et la persévérance pour pouvoir à chever ce travail.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu le jour sans l'aide et l'encadrement de Dr BILEMBRI SAHRA Amel

On le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

On remercie nos chers parents pour leur soutien financier et moral continu

Nous tenons également à remercier à Pr SLIMANI Souheila qui nous a fait un grand honneur en acceptant de présider ce jury.

Nos remerciements s'orientent ensuite vers Dr KHADRI Sihem qui nous a fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail.

Remercîments s'adressent également au médecin et le groupe de service anatomie pathologique et aussi le groupe de CRMT sonatrach pour son aide pratique et son soutien moral et ses encouragements.

Un grand merci au doctorante BOUACHA Anissa pour sa disponibilité et son aide pratique et pour les bonnes conditions qu'elle à assurer et la collègue hind pour son aide pratique

Dédicace

Je dédie ce travail à :

À Mes très chers parents

Pour leur soutien continu tout au long de ma vie et de mon parcours scolaire, leurs émotions, leur amour, leur fatigue et leurs encouragements

Toujours pour moi autant d'exemple et source de tendresse et de courage.

À Mon cher fiancé Chamss Edin

Pour son soutien continu, ses encouragements et son aide dans l'organisation de ma mémoire

À Mes Chers frères

Amer et ses enfants, Ahmed et Mouhamed, Ils sont mon soutien

À Mes chères soeurs

Souhila, Karima et Meriem et leurs enfants pour leur amour, et leur encouragement

À les femmes de mes frère Asma et Chaima , À mon ami proche Marwa et À toute ma famille et mes amis

Friga Fatima

Dédicaces

*À mon père et ma mère, ma chère sœur et mes chers frères qui
Vous avez toujours cru en moi et su me redonner confiance lorsque
la motivation n'était plus au rendez-vous. Acceptez ce travail
comme le témoignage de mon profond amour et mon attachement
indéfectible.*

Djekrif Douaa

Dédicace

Je dédie ce mémoire

À mon père qui m'a soutenu et encouragé durant les années qu'il a vécu.

À ma mère qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études.

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

À mes sœurs wafa et khouloud, mes neveux ilyes et djessim et chouaib et ma nièce ihcen qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement encouragé tout au long de mon parcours.

À ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité.

À tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès

À tous ceux que j'aime

CHAREF AMIRA

Liste des figures

Figures	page
Figure 1 : schéma simplifié du système immunitaire. Tc, Lymphocytes T cytotoxiques ; Th, Lymphocytes T auxiliaires	06
Figure 2 : image réel présente la fleur du gattilier, et fruit du gattilier	08
Figure 3 : rats de l'expérience	11
Figure 4 : schéma récapitulatif de protocole expérimentale	12
Figure 5 : Préparations des organes pour l'étude histologique	13
Figure 6 : étapes de réalisation des coupes histologique.	14
Figure 7 : variation de nombre des globule blancs ($\times 10^9/L$)	15
Figure 8 : les variation du taux de la Ferritine (mg / ml)	16
Figure 9 : les variations du taux de la Crp (mg/l)	17
Figure 10 : Des coupes longitudinales de foie(A), et de la rate (B) de pancréas (C)	18

Liste des tableaux

tableaux	page
représente la classification taxonomique de la plante Selon « An Integrated System of Classification of Flowering Plants (1981) »	09

La liste d'abréviation :

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CD34+ : Cluster De Différenciation

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

TC : Lymphocyte T Cytotoxique

Th: Lymphocyte T Helper

NK: Naturel killer

BCR: Recepteur Cellule B

TCR : Recepteur cellule T

IGM : Immunoglobulines M

IGD : Immunoglobulines D

IL-1 : Interleukine-1

IL-4 : Interleukine-4

TNF- α : Facteurs De Nécrose Tumorale A

IFN γ : Interféron Γ

PMS : Syndrome Prémenstruel

LH : Hormone Lutéinisante

CRP : Protéine C Réactive

FNS : Numération De La Formule Sanguine

- **Remercîment**
- **Dédicace**
- **Liste des figures**
- **Listes des tableaux**

Sommaire

Introduction	01
--------------------	----

Revue Bibliographique

1. Hématopoïèse.....	02
2. Système immunitaire.....	04
2.1. Les Cellules immunitaires.....	05
3. Plante d'étude : <i>Vitex agnus castus</i>	08
5.1 Composition chimiques.....	09
3.2. Utilisations thérapeutiques.....	09
3.3. Activités pharmacologiques.....	09

Matériels et méthodes

1. Matériels.....	11
1.1. Animaux d'étude.....	11
1.2. Plante d'étude.....	11
2. Méthodes.....	11
2.1. Méthode d'extraction	11
2.2. Etude in vivo de l'effet immuno- modulateur de l'extrait <i>Vitex agnus castus</i>	12
2.3. Etude histopathologique.....	13

Résultats et discussion

1. Résultats	15
1.1. Effets de l'extrait de <i>Vitex agnus castus</i> sur les paramètres hématologiques.....	15

1.2. Effets de l'extrait de Vitex agnus castus sur les paramètres histologiques.....	17
2. Discussion.....	19
Conclusion.....	20
Références Bibliographiques.....	22

Résumé

Le but de notre étude est d'évaluer l'effet immunomodulateur de l'extrait alcoolique *Vitex agnus castus* largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Pour cela, nous avons utilisé un modèle animal d'immunoaltération en utilisant la prédnisolone pour altérer le système immunitaire chez le rat. Les tests sont effectués sur des groupes de rats traités ou non par la prédnisolone (0.6mg/kg) avec ou non administration orale de l'extrait du gattilier (100mg/kg). Après 30 jours consécutifs de traitement, un échantillon de sang a été prélevé (pour le dosage de quelques paramètres sanguins) et de quelques organes (pour l'étude histologique). Les résultats obtenus indiquent que le traitement par la prédnisolone seule et avec l'extrait du gattilier n'a pas affecté de manière significative ($p > 0.05$) le nombre des leucocytes chez ces rats comparés aux rats du groupe témoin. Par contre, nous avons montré que la prédnisolone a réduit très significativement le taux de la ferritine $75\% \pm \text{SEM}$. Cette diminution a été inhibée de près de $4 \pm \text{SEM} \%$ par le traitement oral au Gattilier. Par ailleurs, le dosage de la CRP chez les rats étudiés, n'a pas montré de résultat concluant vu qu'il n'y a pas eu de différence significative au sein des différents groupes de rats. Outre les paramètres sanguins testés, l'observation microscopique des coupes histologiques du foie, de la rate et du pancréas a montré une inflammation du foie et une adénite réactionnelle du pancréas chez rats traités par la prédnisolone, et l'extrait du gattilier administré par voie orale n'a pas remédié aux atteintes de ces organes. En prenant en considération l'ensemble des résultats apportés par cette étude, il est possible de suggérer que l'extrait hydroalcoolique a donné un effet immunomodulateur modéré dans nos conditions de travail, car de tous les paramètres testés, il a pu rétablir uniquement le taux de la ferritine qui a été fortement diminuée par la prédnisolone.

Mots clés :

Vitex agnus castus, corticoïde, ferritine, protéine C réactive, leucocytes, extrait de plante, immunomodulateur, inflammation

الغرض من دراستنا هو تقييم التأثير المناعي للمستخلص الكحولي *Vitex agnus castus* الذي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في الجزائر. لهذا، استخدمنا نموذجًا حيوانيًا للتحليل المناعي باستخدام بريدينزولون لاثارة الجهاز المناعي في الفئران. يتم إجراء الاختبارات على مجموعات من الفئران المعالجة أم لا باستخدام بريدينزولون (0.6 مجم / كجم) مع أو بدون تناول عن طريق الفم (100 مجم / كجم) لمستخلص النبتة. بعد 30 يومًا متتاليًا من العلاج، تم أخذ عينة دم (لتحديد بعض معلمات الدم) وبعض الأعضاء (لدراسة النسيجية). تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن العلاج باستخدام بريدينزولون وحده ومع مستخلص النبتة لم يؤثر بشكل كبير على عدد الكريات البيض في هذه الفئران مقارنة بالجرذان من المجموعة الشاهدة. من ناحية أخرى، أظهرنا أن بريدينزولون خفض بشكل كبير مستوى الفيريتين $SEM \pm 75\%$. تم منع هذا الانخفاض بنسبة قليلة جدا عن طريق العلاج عن طريق الفم مع مستخلص كف مريم. علاوة على ذلك، لم يظهر تحليل CRP في الفئران المدروسة أي نتيجة قاطعة حيث لم يكن هناك فرق كبير داخل مجموعات مختلفة من الفئران. بالإضافة إلى تحاليل الدم التي تم اختبارها، الملاحظة المجهرية للأقسام النسيجية للكبد والبنكرياس والطحال أظهرت وجود التهاب في الكبد والتهاب غدي تفاعلي في البنكرياس في الفئران المعالجة عن طريق الفم بالبريدنيزولون ومستخلص النبتة الذي لم يعالج الضرر الذي لحق بهذه الأعضاء عكس الطحال الذي ظهر سليم في جميع المجموعات. مع الأخذ في الاعتبار جميع النتائج التي قدمتها هذه الدراسة، من الممكن أن نقترح أن مستخلص الكحول المائي أعطى تأثيرًا مناعيًا معتدلًا في ظروف عملنا، بسبب جميع التحاليل التي تم اختبارها، كانت قادرة على استعادة مستوى الفيريتين بنسبة قليلة فقط الذي تم تخفيضه بشكل كبير بواسطة بريدينزولون

الكلمات الرئيسية:

Vitex agnus castus , الكورتيكوستيرويد، الفيريتين، البروتين التفاعلي C ، الكريات البيض ، مستخلص النبات ، التعديل المناعي ، الالتهاب

Abstract

The purpose of our study is to assess the immunomodulatory effect of the alcoholic extract *Vitex agnus castus* widely used in traditional medicine in Algeria. For this, we used an animal model of immunoalteration using prednisolone to alter the immune system in rats. The tests are carried out on groups of rats treated or not with prednisolone (0.6mg / kg) with or without oral administration of the extract of the plant (100mg / kg). After 30 consecutive days of treatment, a blood sample was taken (for the determination of some blood parameters) and some organs (for the histological study). The results obtained indicate that the treatment with prednisolone alone and with the extract of plant the did not significantly affect ($p > 0.05$) the number of leukocytes in these rats compared to rats of the control group. On the other hand, we have shown that prednisolone very significantly reduced the level of ferritin $75\% \pm \text{SEM}$. This decrease was inhibited by almost $4 \pm \text{SEM} \%$ by oral treatment with chaste tree. Furthermore, the dosage of CRP in the rats studied did not show any conclusive result since there was no significant difference within the different groups of rats. In addition to the blood parameters tested, microscopic observation of histological sections of the liver, spleen and pancreas have shown inflammation of the liver and reactive adenitis of the pancreas in rats treated with prednisolone, and the extract of chaste tree administered orally did not remedy the damage to these organs. Taking into consideration all of the results provided by this study, it is possible to suggest that the hydroalcoholic extract gave a moderate immunomodulatory effect in our working conditions, because of all the parameters tested, it was able to restore only the level of ferritin which was greatly reduced by prednisolone.

Keywords :

Vitex agnus castus, corticosteroid, ferritin, reactive protein C, leukocytes, plant extract, immunomodulator, inflammation

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le corps humain est continuellement exposé à différents types d'agressions susceptibles de menacer son équilibre et son homéostasie. Ces agressions peuvent être d'origine exogène comme des agents infectieux ou des traumatismes, ou endogène comme des cellules tumorales qui se développent dans l'organisme. Pour faire face à ces agressions, l'organisme est doté d'un système de défense élégant et très complexe représenté par le système immunitaire qui réagit aux attaques par une réponse qui peut être innée et rapide ou adaptative et tardive. Ce système immunitaire censé protéger et défendre l'être vivant peut-être lui-même à l'origine de la base pathologique de différentes maladies comme les maladies inflammatoires ou les immunodéficiences. On a recours dans ces cas-là à des traitements par des immunomodulateurs qui sont des substances d'origine naturelle ou synthétique qui peuvent moduler les composantes du système immunitaire par une stimulation spécifique ou un effet supprimeur (**Juyal et Singla, 2001**).

L'immunomodulation utilisant les plantes médicinales est d'un intérêt primordial dans le milieu scientifique car elle pourrait fournir une alternative à la chimiothérapie conventionnelle pour une très large gamme de maladies (**Ganju et al., 2003**). En effet, les immunomodulateurs d'origine naturelle sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux molécules pharmacologiques habituellement utilisées.

Les plantes médicinales demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement, en absence d'un système de santé moderne (**TABUTI et al., 2003**). Le territoire algérien, de par sa position géographique, présente une large gamme de végétation riche et de diverses d'étages bioclimatiques de plantes utilisées comme condiments, aliments naturels ou encore à usage thérapeutiques (**Emberger, 1971**). Parmi ces plantes *Vitex agnus castus* (le gattilier) est une plante de la famille des Lamiaceae réputée en médecine folklorique pour avoir des activités biologiques très intéressantes comme notamment les activités immunomodulatrices.

Nous avons alors orienté notre travail dans ce sens, et nous avons choisi de tester l'extrait du gattilier pour essayer de confirmer et évaluer son effet immunomodulateur. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle animal d'immunoaltération chez le rat induit par la prédnisolone.

Revue
Bibliographique

Revue bibliographique

1. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus physiologique couvrant la production et le renouvellement de l'ensemble des cellules sanguines. Le renouvellement permanent de ces cellules qui représente environ 90% de la production de nouvelles cellules du corps humain n'est possible que grâce à une petite sous-population des cellules : les cellules souches hématopoïétiques (**Cosgrove et al., 2021**). L'hématopoïèse commence dans le sac vitellin et passe temporairement dans le foie avant d'établir finalement une hématopoïèse définitive dans la moelle osseuse et le thymus (**Tavian et al., 2010**)

- **Les cellules souches hématopoïétiques (HSC)**

Ce sont des cellules primitives en phase G0 et présentant les molécules CD34+à leur surface. Elles se caractérisent par deux propriétés fondamentales : l'auto-renouvellement et la capacité de différenciation en l'ensemble des types cellulaires sanguins. Le terme est apparu à la fin du XIXème siècle pour désigner les cellules de la moelle osseuse ayant un double potentiel de différenciation myéloïde et érythroïde (**Pappenheim, 1896**). La capacité d'auto-renouvellement de ces cellules, quant à elle, ne sera démontrée qu'avec les travaux de Becker et de Till et McCulloch dans les années 60 (**Becker et al, 1963**)

- **Les Progéniteurs**

Ce sont des cellules qui perdent progressivement leur capacité d'auto-renouvellement et sont capables de se différencier et de s'engager dans une lignée lymphoïde soit myéloïde (**Chapman et Zhang, 2022**).

- **Les précurseurs**

Ce sont les premières cellules morphologiquement identifiables, ils ont perdu toute capacité d'autorenouvellement.

Les différents précurseurs existant sont (**Ward et Linden, 2018**) :

- Les myéloblastes (Futurs polynucléaires)
- Les proérythroblastes (Futurs hématies)
- Les mégacaryoblastes (Futurs plaquettes)
- Les lymphoblastes (Futurs lymphocytes)
- Les monoblastes (Futurs monocytes)

- **Les cellules matures**

Ce sont les cellules terminales fonctionnelles ayant des modifications spécifiques (noyau, membranes ...), les différentes lignées étant (**Loughran, et al., 2020**) :

- Lignée érythrocytaire
- Lignée plaquettaire
- Lignée granulo-monocytaire
- Lignée lymphoïde

2. Système immunitaire

Le système immunitaire est un réseau complexe formé d'organes, de tissus, de cellules spécialisées et de protéines qui, ensemble, tentent de protéger le corps humain contre les attaques des 'envahisseurs étrangers' susceptibles de causer des infections. Une déficience du système immunitaire peut se manifester par un grand nombre de maladies telles que les infections, le vieillissement, les allergies, les troubles de divers organes ainsi qu'une série de maladies allant du cancer au sida (**Cherng et al., 2008**).

La réponse immune est la façon la plus efficace du système immunitaire pour contrecarrer et éliminer l'agent infectieux de l'organisme. Ceci est accompli par l'action mutuelle de l'immunité innée (rapide mais non spécifique) et adaptative ou acquise (rapide et très spécifique) (**Volman et al., 2008**).

Le système immunitaire inné est constitué de barrière anatomique, de molécules secrétées ainsi que de composants cellulaires. Parmi les barrières mécaniques de l'anatomie on retrouve la peau, les épithéliums internes, le péristaltisme intestinal et les oscillations des cils broncho-pulmonaires. Le toutes constituent la première ligne de défense. L'épithélium agit comme une barrière physique à l'entrée des microbes et produit également un large éventail de facteurs antimicrobiens. Leucocytes qui sont impliqués dans cette réponse sont des granulocytes (neutrophiles), les monocytes / macrophages, les cellules tueuses naturelles (NK) et le système de complèment. Ces cellules jouent un rôle important dans la phagocytose des agents pathogènes, la production de radicaux libres (oxydative), la production de cytokines, et la présentation de l'antigène aux lymphocytes (**Aichour.R,2017**).

Contrairement à l'immunité rapide et non spécifique, la réponse immunitaire adaptative est plus lente, mais très spécifique. Cette réponse dépend de la production d'anticorps par les lymphocytes B dirigés contre des antigènes spécifiques présents sur les pathogènes (appelé réponse immunitaire humorale). Elle implique aussi les lymphocytes T cytotoxique (Tc) et les lymphocytes T auxiliaires (Th) pour l'attaque directe contre le photogène (réponse immunitaire à médiation cellulaire). Ces cellules sont responsables de la mémoire immunologique, suite aux contacts répétés avec le même antigène (**figure01**).

Lorsque les leucocytes du système immunitaire inné sont activés, ils secrètent les cytokines et présentent l'antigène aux lymphocytes B et T, ces derniers activent à leur tour le système immunitaire adaptatif. Cela représente l'interaction entre les deux systèmes, qui génère finalement une réponse immunitaire (**Volman et al., 2008**).

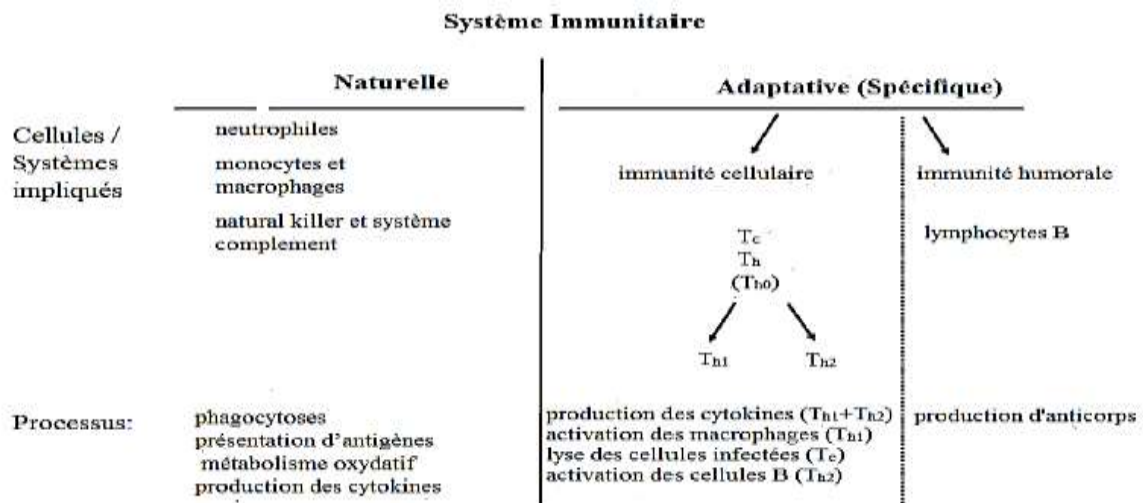


Figure01 : schéma simplifié du système immunitaire. Tc, Lymphocytes T cytotoxiques ; Th, Lymphocytes T auxiliaires (Volman et al., 2008).

2.1. Cellules immunitaires

Les cellules impliquées dans la défense de l'organisme sont les leucocytes produits dans la moelle osseuse, où beaucoup d'entre elles mûrissent et migrent vers les tissus en circulant dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Certaines d'entre elles sont responsables de la défense générale, tandis que d'autres sont formées pour lutter contre les agents pathogènes hautement spécifiques. Pour un fonctionnement efficace, une coopération continue entre ces cellules est nécessaire. Il existe différents types de leucocytes issus de deux lignées différentes, les cellules lymphoïdes et les cellules myéloïdes (Rima Daoudi, 2016).

Les lymphocytes sont des petits leucocytes qui possèdent une grande responsabilité dans le système immunitaire. Il existe deux principaux types de lymphocytes : lymphocytes B (ou cellules B), qui lors de l'activation, se différencient en plasmocytes (ou des cellules plasmatiques) capables de sécréter des anticorps et les lymphocytes T (ou cellules T) (Rima Daoudi, 2016)

a. Lymphocytes B

Les lymphocytes B ont une durée de vie relativement courte par rapport aux lymphocytes T. Les lymphocytes B, ou cellules B, sont des lymphocytes qui ont pour rôle de sécréter des immunoglobulines. Les cellules B matures expriment à leur surface des immunoglobulines IgM ou IgD, qui jouent le rôle de récepteurs spécifiques de l'antigène ou BCR (B Cell Receptor), mais aussi différents marqueurs de surface, dont les molécules HLA de classe I et de classe II. Lorsque les lymphocytes B sont activés, ils prolifèrent en présence d'IL-4 puis ils se transforment en

lymphoblastes et effectuent une prolifération clonale en plasmocytes. Ces derniers secrètent des anticorps, des immunoglobulines (Ig) libres dont la spécificité est identique à celle des Ig de surface du lymphocyte B original (**Aichour, 2017**).

b. Lymphocytes T

Les cellules T sont appelées ainsi parce qu'elles arrivent à maturité dans le thymus. Elles sont pour fonction la réglementation des actions des autres cellules, et attaquer directement les cellules hôtes infectées. Les lymphocytes T peuvent être subdivisés en trois sous-classes principales: les cellules T aideuses, (Thelper), les cytotoxiques ou cellules T tueuses (T killer) et les lymphocytes T suppresseurs (suppressor T cells). (**Henry Dreher ,1995**)

Les cellules T aideuses sont essentiellement chargées de l'activation des cellules B. Les cellules T tueuses, sont capables d'éliminer les envahisseurs microbiens, les virus ou les cellules cancéreuses. Une fois activées et liées à leurs ligands, elles injectent des produits toxiques dans les autres cellules, perforant leur membrane de surface, et provoquant leur destruction. Les lymphocytes T suppresseurs quant à elles, sont essentielles au maintien de la réponse immunitaire. Elles servent à éviter les réactions immunitaires non appropriées (maladies auto-immunes). Les lymphocytes B et T expriment sur leur surfaces, des récepteurs hautement spécifiques pour un déterminant antigénique donné. Le récepteur des cellules B est une forme de la molécule d'anticorps lié à la membrane, et qui sera sécrété après que la cellule soit convenablement activée. (**Charles A Janeway et al.,2005**)

c. Les lymphocytes Natural Killer (NK)

Les cellules tueuses naturelles reconnaissent les cellules infectées (en particulier par les virus) ou les cellules modifiées (par exemple les cellules tumorales). Ces lymphocytes font partie de l'immunité innée car ils n'expriment pas de récepteur à l'antigène comme le TCR ou le BCR. Ils expriment cependant des récepteurs activateurs ou inhibiteurs qui leur sont propres et libèrent des cytokines comme l'IFN γ ou des protéines cytotoxiques contenues dans leurs granulations (**Guislain et Michelles ,2018**)

Les cellules NK sont présentes :

- dans la circulation sanguine, où elles représentent 5 à 15 % des lymphocytes
- dans les organes lymphoïdes (rate, amygdales, ganglions périphériques)
- dans certains tissus (foie, poumon, placenta...) où elles exercent un rôle de sentinelle.

Leur renouvellement dans le sang est d'environ deux semaines.

d. Macrophages :

Les monocytes sont formés à partir de la moelle osseuse. Ils ont une demi vie de 24-100 heures et ne constituent que 2-3% des leucocytes circulants (**Tanner et al., 1984 ; Russo-Marie et al., 1998**). C'est au niveau du site inflammatoire que les monocytes se différencient en macrophages. Les macrophages servent de cellules présentant l'antigène et lorsqu'ils sont armés d'IgG spécifique ils agissent comme des cellules cytotoxiques (**Shah et al., 2002**). Les macrophages sont impliqués dans la défense de l'organisme contre les microorganismes, interviennent dans l'élimination des cellules mortes ou endommagées. Ils interviennent également dans la modulation de la réponse immunitaire et la synthèse des molécules biologiquement actives comme les composants du complément, les prostaglandines, les espèces réactives oxygénées, des cytokines (interféron) et des protéases neutres comme l'élastase (**Tanner et al., 1984**). Les macrophages sont activés dans des sites inflammatoires. Ils sont aussi activés par les lipopolysaccharides bactérien, l'interféron, l'IL-12, IL-18, le rayonnement ultraviolet et l'ozone. Les macrophages activés peuvent efficacement détruire les microbes, les parasites et les cellules tumorales (**Shah et al., 2002**). Grâce à TNF- α et d'IL-1, les macrophages contrôlent la prolifération, la différenciation, et les fonctions effectrices des lymphocytes (**Suigiura et al., 2001**).

3. Plante d'étude : *Vitex agnus castus*

C'est un arbuste qui grandit au bords des rivières au pays méditerranées et l'Europe du sud et de l'est en plus dans l'Asie centrale (Chiadet al., 2015). Appelé en français : gattilier, arbre au poivre, agneau-chaste, poivre de moine, poivre sauvageou encore petit poivre. Alors qu'en arabe la plante est dite : شجرة إبراهيم, كف مريم, حب النسل (Ghedira et Goetz,2016). Ce petit arbre est considéré comme une plante médicinale vu qu'elle est utilisée depuis l'antiquité pout traiter plusieurs problèmes de santé. (Daovy Allais, 2008). En effet, C'est un arbre qui ne dépasse 6 mètre de haut, possède des feuilles en forme de doigts et fleurs violet, fleurit dans l'été qui produit après la pollinisation un fruit brun foncé à noir de taille similaire aux grains de poivre possédant sa saveur et son arôme également un arôme et saveur de poivre. (Murray, 2020)



Figure 02 : fleur du gattilier (image perssonnelle,2022) et fruit du gattilier (Daovy Allais, 2008).

Le Tableau 01 représente la classification taxonomique de la plante Selon « An Integrated System of Classification of Flowering Plants (1981) »

règne	Plantae (Végétal)
Embranchement	Magnoliophyta (=Spermaphytes)
classe	Magnoliopsida
ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Vitex L.
Espèce	<i>Vitex agnus-castus L.</i>

3.1.Composition chimiques

Le gattilier est principalement composé de terpènes (avec l'huile essentielle, les iridoïdes et les diterpènes), de composés phénoliques (avec les phénols, les flavonoïdes, les tanins) mais aussi d'autres composés présents en moindre quantité (huiles grasses) (**Daovy Allais et al. ; 2008, Bruneton et al ; 2009**).

3.2.Utilisations thérapeutiques

Le gattilier est utilisé depuis longtemps pour traiter plusieurs troubles et maladies comme le syndrome prémenstruel, l'acné, les Fausse couche habituelle, l'insuffisance de lactation, l'hyperprolactinémie ainsi que les problèmes de fertilité (**Romm et al., 2010**).

3.3.Activités pharmacologiques

Les effets du gattilier ont essentiellement un caractère hormonal ; une action inhibitrice sur la sécrétion de prolactine en raison de sa capacité à se lier aux récepteurs de la dopamine et une action lutéotrope en cas d'insuffisance de corps jaune) (**Murray, 2020**). Il équilibre la production de progestérone et d'œstrogènes durant le cycle menstruel, Il participe à la production du LH.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Animaux d'étude

Notre étude a été effectuée sur des rats *Albinos wistar* fournis par l'institut Pasteur d'Alger dont le poids varie de 130g à 200g. Ils ont été utilisés après une période d'adaptation de 19 jours, où ils sont gardés dans des cages en polypropylène avec accès libre à l'eau et à l'alimentation.



Figure03 : rats de l'expérience

1.2. Plante d'étude

Nos tests ont été effectués sur l'extrait brute des feuilles du gattilier ou *Vitex agnus castus*. Cette dernière a été récoltée au mois de novembre dans la ville d'Azzaba et lavée deux fois et séchée pendant 21 jours à l'air libre à température ambiante, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique et gardée à l'abri de l'air et de la lumière jusqu'à utilisation.

2. Méthodes

2.1. Méthode d'extraction

La poudre résultante du broyage (500g) du gattilier est soumise à une extraction hydro-alcoolique (méthanol/eau 5V/1V), Le mélange plante solution hydro-alcoolique est laissé sous agitation pendant 24h suivi par une filtration sur du papier Watman. Le filtrat récupéré (1400ml) est soumis à une évaporation rotative sous vide à 40°C jusqu'à élimination totale du solvant. Au bout de l'évaporation rotative, un mélange visqueux est obtenu qui est alors séché dans une étuve à 40°C.

2.2. Etude *in vivo* de l'effet immuno- modulateur de l'extrait *Vitex agnus castus*

L'effet immuno-modulateur de l'extrait préparé est testé sur des modèles *in vivo* (Mesaik et al., 2009) sur des rats dans lesquels des rats ont été traités ou non oralement aux corticoïdes (prédnisolone 0.6 mg/kg) une heure avant l'administrion orale ou non de l'extrait étudié (100mg/kg) et ce durant un mois. Après 30 jours de traitement, les rats ont été sacrifiés par asphyxie au chloroforme. Un prélèvement sanguin intracardiaque est alors effectué pour avoir un volume important de sang qui sera alors soumis à des analyses hématologiques, la ferritine et la CRP (laboratoire d'analyses médicales **BILEMBRI** et **CRMT SONATRACH** a **SKIKDA**). Des biopsies de chacun du foie, de la rate et du pancréas ont été prélevées sur chaque rat pour être soumis à une analyse anatomopathologique au niveau de **l'EPH de Skikda**. Le schéma ci-dessous résume les différentes étapes de travail

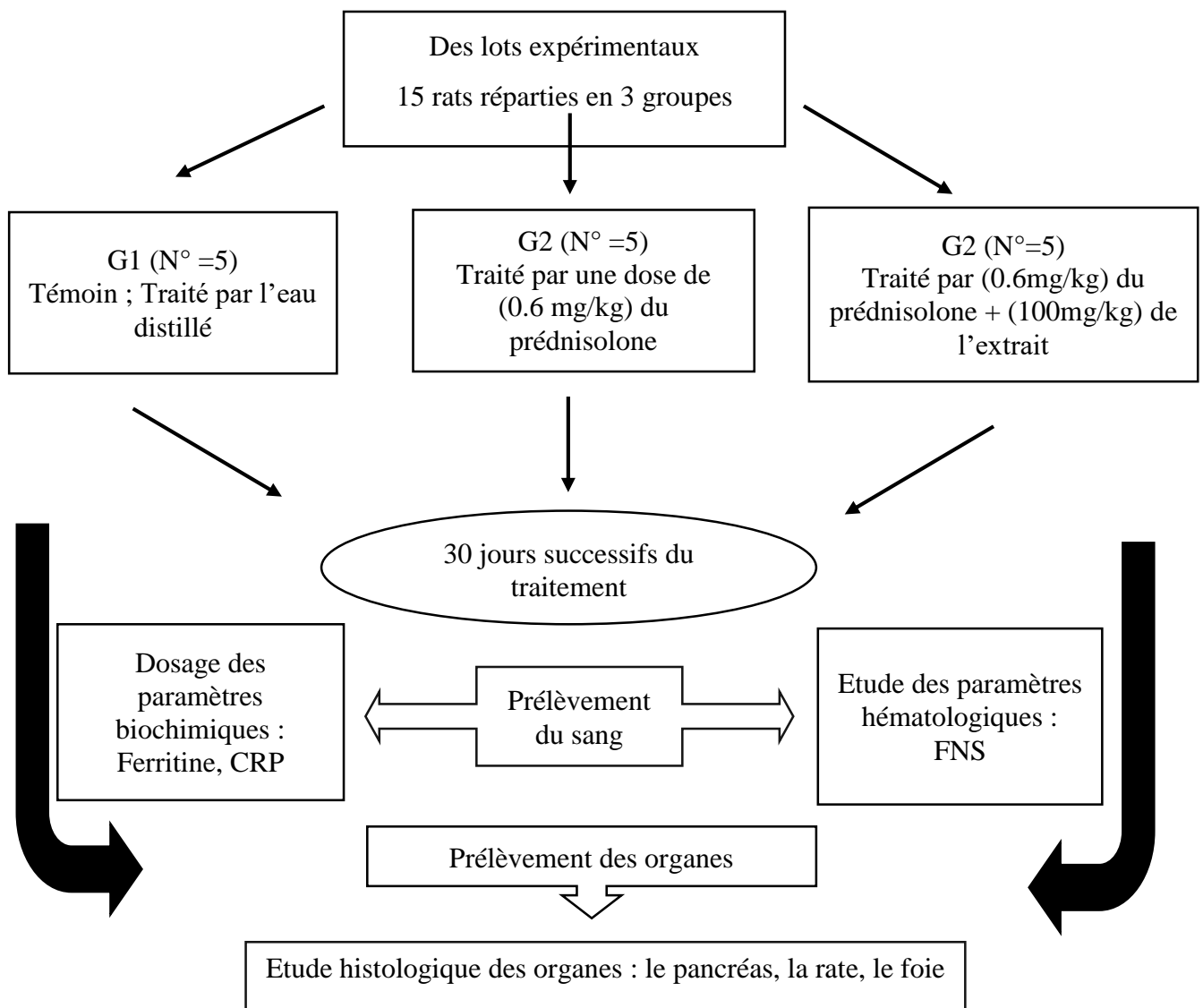


Figure 04 : schéma récapitulatif de protocole expérimentale

2.3. Etude histopathologique

Après le prélèvement sanguin intracardiaque, nous avons prélevé des biopsies d'organes chez les rats étudiés, à savoir le pancréas, la rate et le foie ont été effectuées. Les biopsies sont ensuite rincées à la solution physiologique 0.9% puis conservées dans du formol 10% pour réaliser l'étude histologique qui a été faite au niveau du service d'anatomie, pathologique à **EPH frères Saâd Guermech de Skikda**.

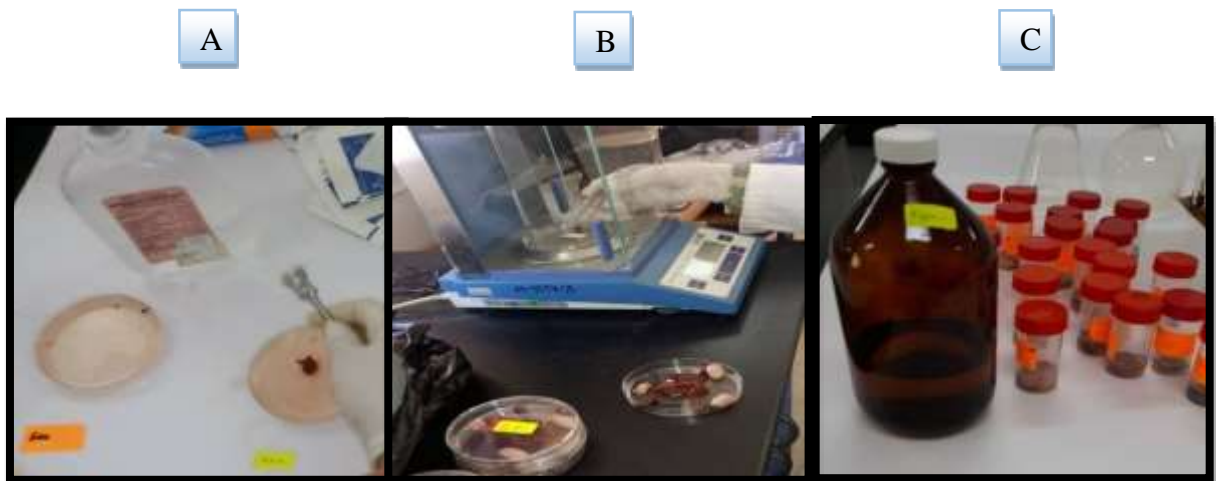


Figure05 : Préparations des organes pour l'étude histologique.

A : Rinçage des organes, **B** : Pesages, **C** : Conservation dans le formol (**Photo personnelle,2023**)

❖ L'étude histopathologique est réalisée selon le protocole suivant (**Marck, 2010**) :

- **Fixation** : les échantillons sont fixés avec du formol dilué à 10%.
- Introduction de ces fragments dans des cassettes d'inclusion, les cassettes ont été marquées sur leur bord
- **Déshydratation** : Ceci par passage du fragment dans des bains d'alcool de concentrations croissantes, Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire, pour pouvoir réaliser une coupe fine
- **Imprégnation** : Par le passage du prélèvement dans un liquide intermédiaire de xylène ou le toluène afin d'en éliminer les traces d'alcool absolu.
- **Inclusion** : Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine (résine blanche opaque)
- **Microtomie** : Réalisation des coupes sur le bloc à l'aide d'un microtome. L'ensemble des tranches obtenues forme un ruban de qualité très fine (2 à 4 μm).

- **Déparaffinage** : La première étape de toute coloration d'une coupe histologique est d'éliminer la paraffine du tissu à 40°C pour que les colorants puissent le pénétrer.
- **Réhydratation** : Consiste à substituer progressivement le solvant du tissu par des bains d'éthanol pour amener à l'eau.
- **Coloration** : Le but de la coloration est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires
- **Montage et Observation microscopique** : Cette opération consiste à fixer à l'aide d'une résine synthétique (goutte de solution *EUKITT*) une lamelle couvre-objet sur la coupe (la lame) afin de la protéger de la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent à l'air et des bris mécaniques.

On obtient, ainsi, une préparation histologique (ou par abus de langage : une lame histologique) prête à être observée au microscope optique.



Figure 06 : étapes de réalisation des coupes histologique.

A : fixation, B : déshydrations, C : inclusion, D : Microtomie : E : coloration, F : Montage et lecture réalisées. (Photos personnelle ;2023)

Résultats et discussion

1. Résultats

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet immuno-modulateur de l'extrait alcoolique de *Vitex agnus castus* ; pour cela des rats ont été soumis à un traitement à la prédnisolone pendant 30 j dans le but de provoquer une altération de la réponse immunitaire, puis traités ou non par la plante d'étude. Des mesures des paramètres hématologiques (nombre des leucocytes, taux de la ferritine et de la CRP) et histologiques sont ensuite effectuées.

1.1. Effets de l'extrait de *Vitex agnus castus* sur les paramètres hématologiques

Les résultats apportés par cette étude montrent que le nombre des leucocytes n'a pas varié de manière significative au sein des différents groupes de travail (figure06). En effet, il est possible de constater sur la figure06 que le nombre des leucocytes mesurés chez les rats témoins est pratiquement identique à ceux mesurés chez les rats du groupe contrôle (+) tout aussi identique à celui récupérés chez les rats traités à la plante. Le test statistique confirme que la différence n'est significative ($P > 0.05$) entre les différents groupes.

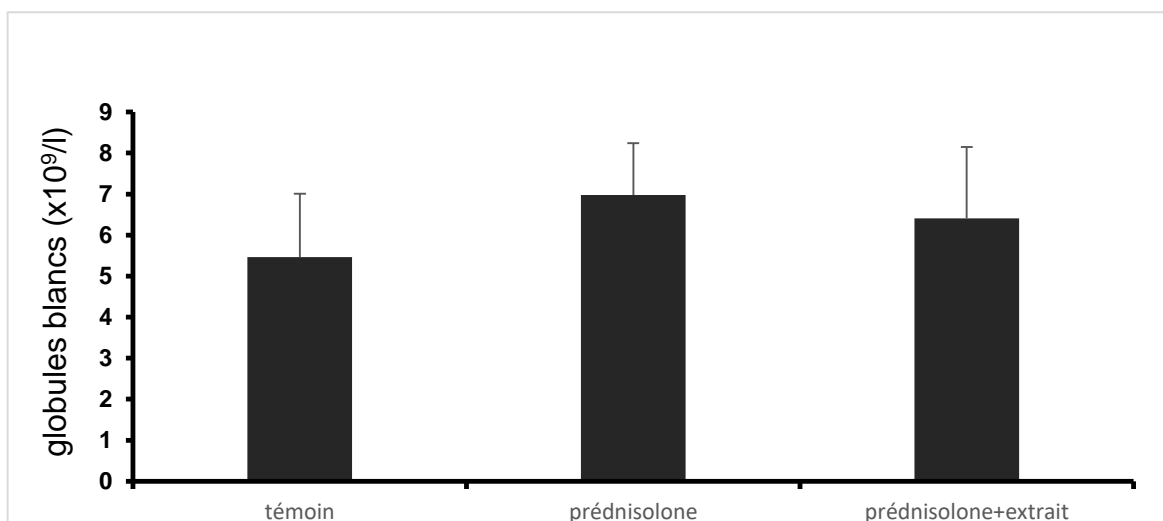


Figure 07 : Effet de la prédnisolone et l'extrait de la plante (*Vitex agnus castus*) sur le nombre des globules blancs, les rats sont traité par 0,6 mg/kg de corticoïde et de 100mg/kg de l'extrait par voie oral , l'histogramme représente la moyenne (n= 5) \pm SEM, $P > 0,05$ par rapport au témoin

Le dosage de la ferritine sanguine chez les rats des différents groupes de travail a révélé que la ferritine est grandement diminuée par le traitement à la prédnisolone $p < 0.01$ (figure 07). En effet, la prédnisolone a diminué le taux de la ferritine chez les rats de près de 75% par rapport au groupe témoin. Par contre, l'administration de l'extrait de *Vitex agnus castus* aux rats traités par la prédnisolone ne les a pas protégés de la diminution du taux de la ferritine (figure 07).

Nous avons constaté une réduction du taux de la ferritine chez ces rats de près de 71%. Il n'y a pas une différence significatif ($p > 0,05$) entre les groupes prédnisolone et prédnisolone + extrait

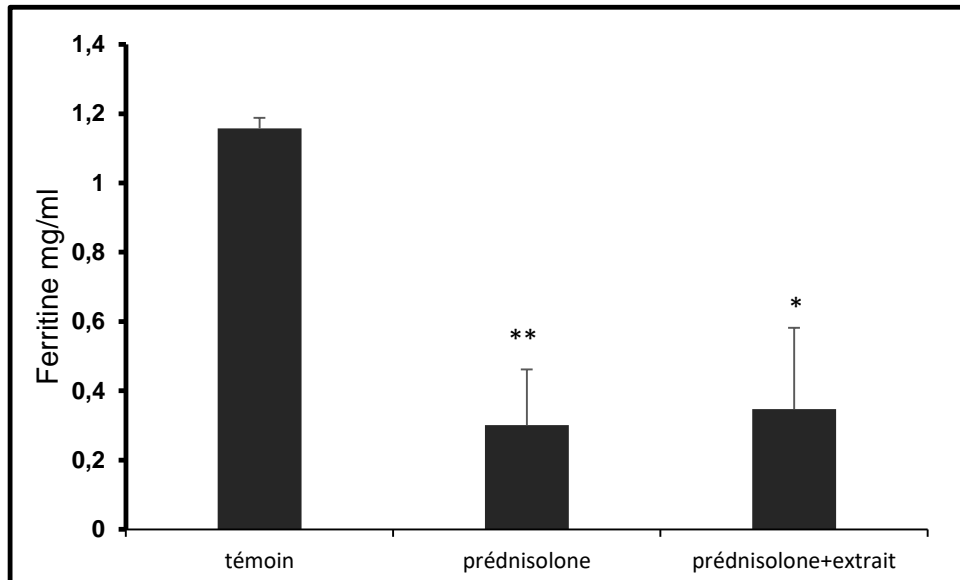


Figure 08 : Effet de la prédnisolone et l'extrait de la plante (*Vitex agnus castus*) sur le taux de la ferritine, les rats sont traité par 0,6 mg/kg de corticoïde et de 100 mg/kg de l'extrait par voie oral, l'histogramme représente la moyenne ($n=5$) \pm SEM, $P < 0,001$, $p < 0,01$ par rapport au témoin

Les résultats obtenus concernant les taux de la CRP indiquent que comme pour le nombre des leucocytes, aucun des traitements administrés n'a affecté de manière significative ($P > 0,05$) le dosage de la CRP chez le rat (figure07). Chez les rats traités par l'extrait étudié, le taux de CRP a été diminué de près de 23%, mais le test de student indique que cette diminution n'est pas statistiquement significative ($P > 0,05$).

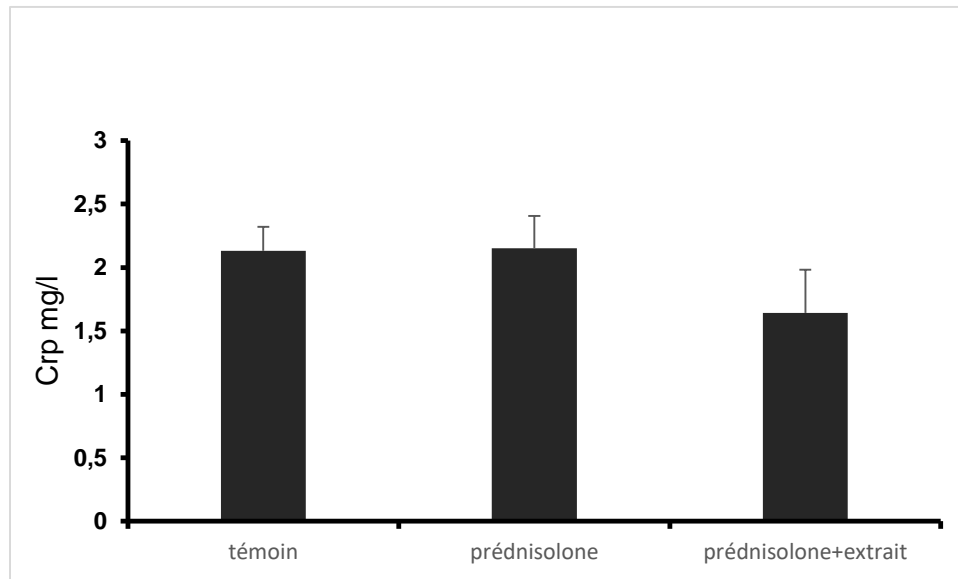


Figure 09 : Effet de la corticoïde et l'extrait de la plante (*Vitex agnus castus*) sur le taux de la Crp, les rats sont traité par 0,6 mg/kg de corticoïde et de 100 mg/kg de l'extrait par voie oral, l'histogramme représente la moyenne (n=5) ± SEM $p > 0,005$ par rapport au témoin

1.2. Effets de l'extrait de *Vitex agnus castus* sur les paramètres histologiques

L'observation microscopique de coupes histologiques réalisées sur la rate, le pancréas et le foie des rats témoins et traités ont révélés des atteintes notoires chez rats traités (prédnisolone et prédnisolone + extrait d'étude).

- Pour le groupe témoin : L'observation des coupes témoins montre que les tissus sont sains et sans aucune anomalie ni infiltration (figure008). En effet, L'observation microscopique du foie a montré qu'il y avait une congestion portal et parenchyme normal et une rate congestive avec parenchyme normal et un pancréas de parenchyme normal
- Pour le groupe traité à la prédnisolone : Le foie est apparu avec des portites chroniques, la rate est d'apparence normale. Par contre tous les rats présentaient une des pancréas avec adénite réactionnelle.

- Pour le groupe corticoïde + extrait : Le foie présente des portites chroniques et pas d'anomalie pour la rate, alors que l'administration de la plante n'a pas réduit les adénites réactionnelles induites par la prédnisolone (**figure 10**).

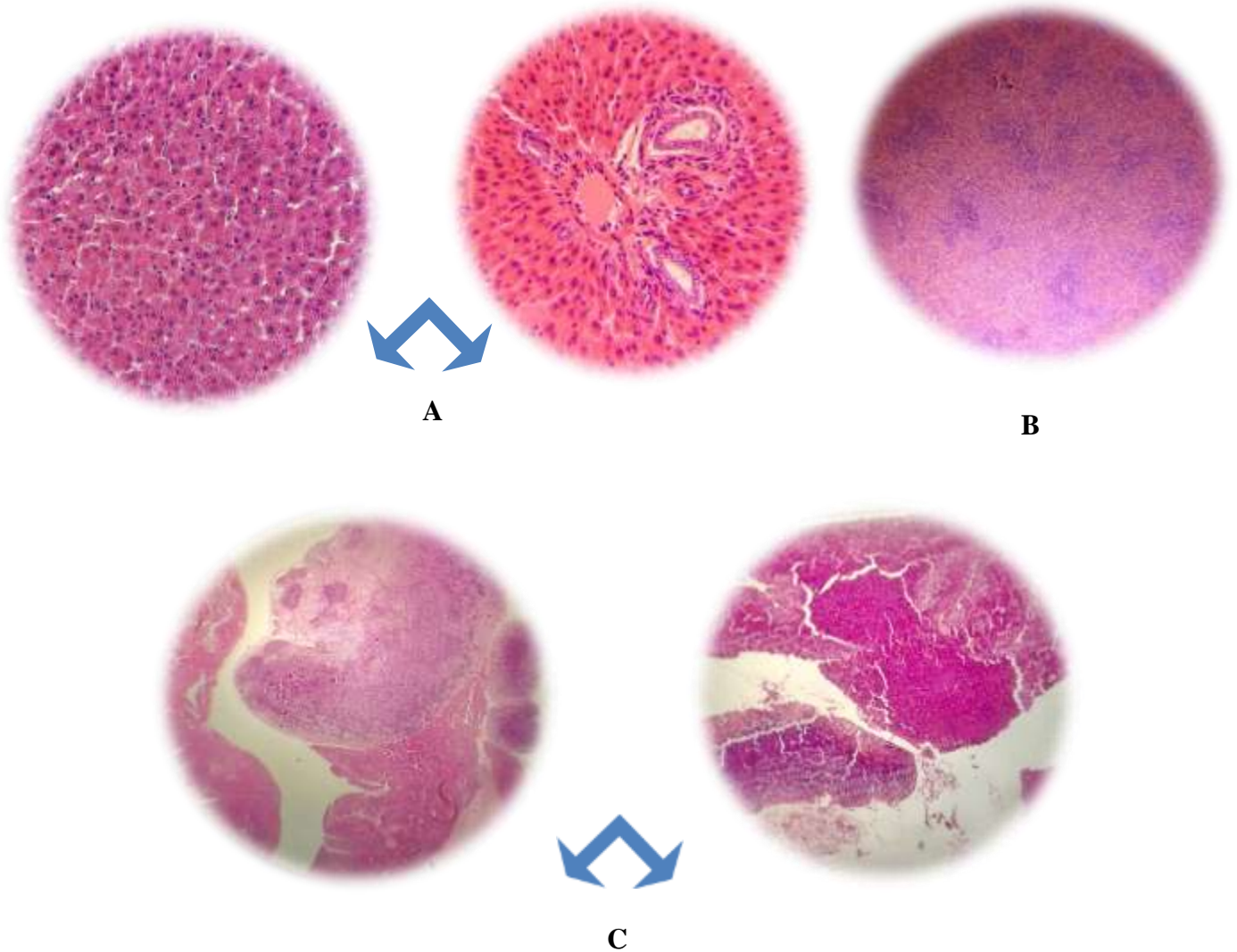


Figure10 : Des coupes longitudinales du foie(A), et de la rate (B) de pancréas (C)

2. Discussion

Notre étude avait pour but d'évaluer l'effet immunomodulateur suggéré par la médecine traditionnelle de *Vitex agnus castus* en Algérie. Pour cela, nous avons mené notre étude sur des groupes de rats que nous avons traités à la prédnisolone comme immunosupresseur pendant 30 jours. Durant toute cette période, les rats recevaient en parallèle une dose de l'extrait de *Vitex agnus castus* pour tester son effet préventif et/ou curative.

Dans les conditions de notre étude, la prédnisolone n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de CRP et le nombre des leucocytes. Il est par ailleurs connu que les corticoïdes produisent plusieurs effets secondaires dont l'immunosuppression (**Bailey and Elliott 2007 ; Bathe, 2007 ; Dutton, 2007**). Il est à noter que la durée du traitement ou la dose de la prédnisolone administrées peuvent être insuffisantes dans notre étude pour que le corticoïde produise ses effets.

Par contre le taux de la ferritine a été significativement affecté et diminué par la prédnisolone. La ferritine est la principale protéine de l'organisme à emmagasiner le fer (**DENISEWILSON, 2014**). Il a été rapporté que la synthèse de l'hepcidine est augmentée lors de la phase aiguë de l'inflammation (**G. Nicolas, 2002**). L'hepcidine est une protéine qui agit en causant la dégradation de la ferroportine à la surface des entérocytes duodénaux, des macrophages et des hépatocytes.

Cela conduit à la séquestration du fer dans les macrophages et à une hyposidérémie inflammatoire. Cette baisse du taux de fer sérique se développe rapidement quelques heures après une infection systémique ou à la suite de l'injection de composants microbiens ou de cytokines (**L.T. Goodnough, 2010**). Ceci pourrait probablement expliquer la diminution de la ferritine dans notre expérience. L'administration de l'extrait du gattilier a protégé de manière notable les rats de la diminution induite par la prédnisolone qui suggère un effet immunomodulateur positif de l'extrait du gattilier.

L'analyse microscopique des coupes histologiques des organes prélevés des rats montre qu'aucun des traitements administrés n'a eu d'effet sur les rates des trois groupes que nous avons étudiés. Par contre, les rats traités à la prédnisolone ont montré des foies avec des portites chroniques et des pancréas avec des adénites réactionnelles. Il est connu que les corticoïdes peuvent induire des effets secondaires de la sorte comme notamment des pancréatites (**Schacke et al. 2002**). L'extrait de *Vitex agnus castus* n'a pas été en mesure de protéger les organes des rats traités à la prédnisolone.

Conclusion

Conclusion

Le but de cette expérience est étudié l'activité immunomodulatrice de l'extrait brute de *Vitex agnus castus* in vivo sur des rats *Albinos wistar*. Pour cela, l'effet de l'extrait d'étude sur le système immunitaire est évalué par son administration à des rats prétraités par la prédnisolone comme immunosupresseur. Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique de cette plante ne modère aucun effet sur le nombre des leucocytes et le taux de la CRP mais le taux de la ferritine il a subi une diminution pour les rats traité par la prédnisolone et l'extrait alors, dans nos conditions d'étude, l'extrait de gattilier n'a pas eu d'effets significatifs sur paramètres sanguins testés. Il est à noter que la durée du traitement pourrait probablement être insuffisante pour faire paraître des différences notoires entre les différents groupes ou la dose utilisée probablement n'a pas des effets immunomodulatrice par rapport aux différents doses.

L'extrait étudié a induit par ailleurs des atteintes hépatiques qui étaient absentes chez les rats témoins aussi des pancréatites pour les groupe qu'ils traités par la prédnisolone et prédnisolone avec l'extrait, ce résultat surprenant doit être exploré et confirmé pour écarter la possibilité qu'il ne soit pas juste un artefact dû aux conditions expérimentales de notre étude par contre les rates des trois groupes ne subit aucune altération histopathologique.

Pour faire suite à ce travail, il serait nécessaire de travailler pour optimiser les conditions d'étude (durée et dose du traitement) dans un premier temps. Par la suite, essayer de confirmer l'effet immunomodulateur obtenu avec d'autres paramètres notamment par le dosage des cytokines qui reflètent de manière plus précise et directe l'état de la réponse immunitaire.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Aichour.R.(2017).effets immunomodulateurs sur les lymphocytes humains
2. algorithms in electrical engineering.Comput Math Electr Electron Eng,
3. Aviva Romm, Mary L. Hardy et Simon Mills (2010) Médecine botanique pour la santé des femme sChurchill Livingstone
4. Beker et al . (1963). «Mécanismes développementaux orchestrant la ›différenciation des cellules souches pluripotentes induites en cellules souches hématopoïétiques». *Hal open sciense*, 13
5. Chapman, Joseph, et Yaoping Zhang . 2022. «Histology, Hematopoiesis .» StatPearls.
6. Charles A Janeway,Paul Travers,Mark Walport,and J Donald Capra.Immunobiology :the immune system in health and disease. Immunobiology 6 th edition,Taylor andFrancis Group;Garland Science, 2005.
7. Cherng JM, Chiang W, Wang IJ, Chun-Yi Lee CL, Shih CM, Chiang LC. (2008).Anthraquinones of edible wild vegetable Cassiatora stimulate proliferation of humanCD4+ T lymphocytes and secretion of interferon-gamma or interleukin 10. *Food.Chem.* 107: 1576-1580.
8. Chiad1*, G. S. (2015). Study of Biological Activity for Some Extracts of Vitex agnus castus L. *المجلة العراقية للعلوم*, 397-406.
9. Claire Masure. Le gattilier (vitex agnus castus L.) : intérêt et utilisation dans le syndrome prémenstruel. *Sciences pharmaceutiques*. 2018. ffduma-022969
10. Daovy Allais, 2. (2008). Le gattilier. *Actualités pharmaceutiques*.
11. Diaz, T. T. (2009). Étude des effets secondaires associés à un traitement., (p. 61)
12. éthépatoprotecteur des extraits de Capparis spinosa, thèse de doctorat. Université FarhatAbbes.
13. FabioF,MaurizioR(2006) Comparison of artificial immune systems and genetic
14. Goetz, K. G. (2016). Gattilier.
15. Guislaine et Michelles .(2018). Immunologie fondamentale et immunopathologie.
16. Henry Dreher.The immune power personality. Penguin Books,Baltimore-
17. inflammation and gastrointestinal disease. *Gut.* 25: 760-783.

18. Loughran, Stephen, Simon Haas, C Adam Wilkinson, Allon Klein , et Marjorie Brand. 2020. «Lineage commitment of hematopoietic stem cells and progenitors: insights from recent single cell and lineage tracing technologies.» PubMed Central 25(4):792811 Farmer, 1995
19. Murray, J. E. (2020). *médecine naturell*
20. Orgrove. (2021). « Mécanismes développementaux orchestrant la différenciation des cellules souches pluripotentes induites en cellules souches hématopoïétiques». *hal open science*, 12.
21. Pappenheim. (1896). « cellules Mécanismes développementaux orchestrant la différenciation des cellules souches pluripotentes induites en souches hématopoïétiques». *Hal open science*, 13.)
22. Rima Daoudi.(2016). Classification du cancer du sein par des approches basées sur les Systèmes Immunitaires Artificiels, thèse de doctorat.Universite PARIS-SACLAY.
23. Russo-Marie F, Peltier A, Polla B. (1998). L'inflammation. Editions John Libbey Eurotext. 482p.
24. Shah V, Bayeta E, Lau BHS. (2002). Pycnogenol Augments macrophage Phagocytosis and cytokine secretion. Pakistan Journal of Nutrition. 1: 196-201.
25. Suigiura H, Suigiura H, Nishida H, Inaba R, Mirbod SM, Iwata H. (2001). Effect of different duration of exercise on macrophages functions in mice. Journal of Applied Physiology. 90: 789-794.
26. Tanner AR, Arthur MJP, Wright R. (1984). Macrophage activation, chronic
27. Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. (2008). Dietary modulation of immune function by β -glucans. Physiology and Behavior. 94: 276–284
28. Ward, M Jerrold, et A Michael Linden. 2018. «Hematopoietic and lymphoid tissues .» Science Direct
29. DENISE WILSON, 2. (2014). *les biomarqueurs en médecine d'urgence*
30. G. Nicolas, C. Chauvet, L. Viatte, J.L. Danan, X. Bigard, I. Devaux, C. Beaumont, A.Kahn, S. Vaulont, The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation, J Clin Invest 110(7) (2002) 1037-44.
31. L.T. Goodnough, E. Nemeth, T. Ganz, Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis, Blood 116(23) (2010) 4754-61.