

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE MOHAMMED SEDDIK BEN YAHIA- JIJEL



Faculté des Sciences Exactes et Informatique

Département de Chimie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master

Option : Chimie Pharmaceutique

Thème :

**Etude de l'activité anti-inflammatoire de quelques
dérivés de l'acide salicylique**

Présentée par :

HACIB Abla

&

HARROUCHE Imane

Devant le jury :

M^{me} Bouider Nafila

MCB

Présidente

M^{me} Bounar Haniya

MCB

Examinatrice

Mr Harrouche Kamel

MCA

Encadreur

Année universitaire : 2020/2021



Remerciements

Nous remercions, tout d'abord, Dieu tout puissant, qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce travail.

Premièrement, nous remercions notre cher professeur, Monsieur Harrouche Kamel pour avoir accepté de nous encadrer et de nous diriger, pour sa compréhension, ses Encouragements ainsi que pour la confiance qu'il nous a accordé en réalisant ce travail, avec tout notre sincères gratitude et respect.

Nous adressons nos sincères remerciements à M^{me} Bouïder N. d'avoir accepté de présider le jury.

Bien entendue, nous remercions chaleureusement à M^{me} Bounar H. pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

A la fin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué d'une façon ou d'autres, de près Ou de loin à la réalisation de ce mémoire de fin d'étude, sans oublier nos collègues d'études et particulièrement notre promotion (La promo de 2020 /2021).



Dédicace

Tout d'abord louange à Allah qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de mes études et m'a inspiré les bons pas.

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A ma grand-mère Massouda

Mes chers frères : Hani et Habib

Mes chères sœurs : Nesrine, Nabila, Amira, Hesna.

Ma binôme Imane avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler nous avons formé une belle équipe

A tous mes amies et particulièrement : Zineb, Moufida, Khadidja, Djamila.

A tout la promotion de chimie pharmaceutique

A tous ceux que j'aime et je respecte.

ABLA



Dédicace

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie

A ma très chère mère, honorable, aimable : tu présente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Je te dédie ce travail en témoignages de mon profond amour.

A mon très cher père Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes très chers frères Mohammed, Seifeddine, Ahcene et Yacine

A mes très chères sœurs

A mes meilleurs amis : Djamila, Ismahane, Moufida, khadidja.

Enfin, je remercie mon binome Abla qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail.

A tous les étudiants de chimie pharmaceutique

A tout la promotion 2020 -2021

IMANE

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
AAS	Acide acétylsalicylique
AB	Acide benzoïque
A2	Apoprotéine 2
AINS	Les anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	Les anti-inflammatoires stéroïdiens
AS	Acide salicylique
BA2H	Acide benzoïque -2-hydroxylase
BSA	Bovin Serum Albumin
COX	Cyclooxygénase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HRBC	Human Red Blood Cell
H₂SO₄	Acide sulfurique
IC	Isochorismate
ICS	Isochorismate synthase
IL-1	Interleukine 1
IL-6	Interleukine 6
IPL	Isochorismate pyruvate lyase
NaOH	Hydroxyde de sodium
NAD	Nicotinamide Adénosine Dinucléotide
PAL	Phénylalanine ammoniac lyase

PG	Prostaglandine
PGD2	Prostaglandine D2
PGE1	Prostaglandine E1
PGE2	Prostaglandine E2
PGF2	Prostaglandine F2
PGG2	Prostaglandine G2
PGH2	Dérivé hydroxylé
PGI2	Prostacycline I2
SAR	Systemic Acquired Resistance
t-CA	Acide trans- cinnamique
TNF	Tumor Necrosis Factor
TXA2	Thromboxane A2
UDPG	Uridine -5-diphosphoglucose
UDPGA	Acide uridine -5-phosphoglucoronique
UV	Ultra-violet

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous

- °C : Température en degrés Celsius
- g/mol : Gramme/ mol
- g/l : Gramme/ litre
- mg/ml : Milligramme /millilitre
- µg/ml : Microgramme/millilitre
- ATM : Atmosphère
- T : Température
- % : Pourcentage d'inhibition

Liste des figures

<i>Figure 01 : Synthèse de l'aspirine</i>	3
<i>Figure 02 : Un modèle de voie de biosynthèse de l'acide salicylique à partir de l'acide shikmique et réalisé par trois voies différentes</i>	6
<i>Figure 03 : Métabolites de l'acide arachidonique (AA)</i>	7
<i>Figure 04 : Modifications structurelles possibles de l'AS</i>	10
<i>Figure 05 : Inhibition de l'enzyme cyclo-oxygénase (COX)</i>	17
<i>Figure 06 : Structures chimiques de quelques anti-inflammatoires stéroïdien</i>	18
<i>Figure 07 : Structure chimique de certains AINS</i>	18
<i>Figure 08 : Mécanisme d'action des AINS</i>	20
<i>Figure 09 : Formule semi- développée de L'AAS (Aspirine)</i>	22
<i>Figure 10 : Mode d'action de l'aspirine</i>	23
<i>Figure 11 : Protocole de préparation de la suspension</i>	28
<i>Figure 12 : Protocole de stabilisation membranaire HRBC</i>	30
<i>Figure 13 : Les mélanges d'essai pour dosage de l'activité de stabilisation de la membrane après la centrifugation</i>	30
<i>Figure 14 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (K104, K105, K108, K109, K110, K113, K114, K116, K122 et l'aspirine)</i>	34
<i>Figure 15 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (HK15, K10, K115 et l'aspirine)</i>	36
<i>Figure 16 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (K112, K119, K120, K121, K123, K125 et l'aspirine)</i>	37
<i>Figure 17 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (K127, b3, b7, b12 et l'aspirine)</i>	39
<i>Figure 18 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (b2, b6, b11, b15 et l'aspirine)</i>	40
<i>Figure 19 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (K126, b10 et l'aspirine)</i>	41

Liste des schémas

<i>Schéma 01 : Synthèse de Kolbe-Schmitt</i>	8
<i>Schéma 02 : Mécanisme de la réaction de Kolbe-Schmitt</i>	9
<i>Schéma 03 : Réaction de synthèse de l'aspirine (réaction d'estérification)</i>	22
<i>Schéma 04 : Schéma de synthèse des molécules de la série 01</i>	24
<i>Schéma 05 : Mécanisme général de la réaction</i>	24
<i>Schéma 06 : Schéma de synthèse des molécules de la série 02</i>	25
<i>Schéma 07 : Mécanisme général de la réaction</i>	26
<i>Schéma 08 : Les composés supérieurs à l'aspirine de la série 01</i>	35
<i>Schéma 09 : Les composés légèrement inférieurs à l'aspirine de la série 01</i>	36
<i>Schéma 10 : Les composés faiblement actifs à l'aspirine de la série 01</i>	37
<i>Schéma 11 : Les composés supérieurs à l'aspirine de la série 02</i>	40
<i>Schéma 12 : Les composés légèrement inférieurs à l'aspirine de la série 02</i>	41
<i>Schéma 13 : Les composés faiblement actifs à l'aspirine de la série 02</i>	42

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Structure et dénomination de l'acide salicylique</i>	2
<i>Tableau 2 : Propriétés physiques d'AS</i>	3
<i>Tableau 3 : Propriétés chimiques d'AS</i>	4
<i>Tableau 4 : Formation de sels carboxylates</i>	11
<i>Tableau 5 : Formation d'esters de la fonction acide</i>	12
<i>Tableau 6 : Quelques médiateurs de la réaction inflammatoire</i>	16
<i>Tableau 7 : Classification chimique simplifiée des AINS</i>	20
<i>Tableau 8 : Classification des principaux AINS selon leur sélectivité d'action anti COX</i>	21
<i>Tableau 9 : Matériel et réactifs d'Inhibition de dénaturation des protéines</i>	26
<i>Tableau 10 : Matériels et réactifs de Stabilisation membranaire des globules rouges</i>	27
<i>Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition des composés de la série 1.</i>	32
<i>Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition de la série 2</i>	38
<i>Tableau 13 : Comparaison des résultats in vivo et in vitro</i>	44

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Première Partie : Recherche Bibliographique

Chapitre I : L'acide salicylique et ses dérivés

I.1. L'acide salicylique.....	2
I.1.1. Structure et dénomination.....	2
I.1.2. Propriétés physiques et chimiques.....	3
I.1.2.1. Propriétés physiques	3
I.1.2.2. Propriétés chimiques.....	4
I.1.3. Historique	4
I.1.4. Biosynthèse de l'acide salicylique.....	5
I.1.5. Mécanisme d'action.....	7
I.1.6. Mode d'action de l'acide salicylique.....	7
I.1.7. Synthèse de l'acide salicylique.....	8
I.1.8. Rôle physiologique de l'acide salicylique.....	9
I.2. Molécules et spécialités dérivées de l'acide salicylique	10
I.2.1. Modifications via la fonction acide.....	10
I.3. Pharmaco-toxicologie.....	14

Chapitre II : L'inflammation

II.1. L'inflammation.....	15
1.1. Généralités sur la réaction inflammatoire	15
1.1.1. Définition	15
1.1.2. Symptômes	15
1.1.3. Les causes de l'inflammation.....	15
1.1.4. Types d'inflammation.....	16
1.1.5. Les médiateurs de l'inflammation	16

1.1.	Les anti-inflammatoires.....	17
1.1.1.	Anti-inflammatoires stéroïdiens (corticoïdes).....	17
1.1.1.1.	Mécanisme d'actions des AIS.....	18
1.1.2.	Anti-inflammatoires non stéroïdiens	18
1.1.2.1.	Mécanisme d'action des AINS	19
1.2.	Classification des AINS	20
1.3.	Les effets des anti-inflammatoire non stéroïdiens.....	21
1.4.	L'acide acétylsalicylique (Aspirine)	22
1.4.1.	Présentation de la molécule de l'aspirine	22
1.4.2.	Passage à l'aspirine	22
1.4.3.	Mode d'action	23

Deuxième Partie : Partie Expérimentale

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1.	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	24
III.2.	Généralité sur les composés étudiés	24
III.2.1.	Voie de synthèse de la série 01.....	24
III.2.2.	Voie de synthèse de la série 02.....	25
III.3.	Matériels et méthodes.....	26
III.3.1.	Matériels.....	26
III.3.2.	Méthodes	27

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro.....	32
IV.1. Stabilisation de la membrane des globules rouges.....	32
IV.1.1. Les produits testés	32
IV.2. Comparaison les résultats in vivo et in vitro	43
IV.3. Inhibition de la dénaturation de l'albumine (BSA).....	45
Conclusion générale	46

Références bibliographiques

Introduction générale

Introduction générale

L'acide salicylique est un métabolite phénolique synthétisé naturellement par un certain nombre de plantes, on le trouve dans les fruits, sous forme estérifiée de salicylate de méthyle [1].

L'acide salicylique et ses dérivés sont utilisés comme substances actives dans plusieurs médicaments, à cause de ses diverses propriétés médicinales, notamment ses propriétés anti-inflammatoires.

Les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS) représentent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde du fait de leurs propriétés anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique. Ils sont utilisés pour le traitement des maladies aiguës et chroniques.

Le travail présenté dans ce mémoire est divisé en deux parties détaillées avec une conclusion générale et références bibliographie :

Dans la première partie on présente une recherche bibliographique, qui sera composée de deux chapitres : le premier chapitre est consacré à la présentation des propriétés chimiques physiques et biologiques de l'acide salicylique et ses dérivés. Le deuxième chapitre est consacré à l'illustration de l'inflammation et de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*.

Dans la deuxième partie on expose une évaluation expérimentale de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro* des dérivés de l'acide salicylique par l'étude de l'inhibition de la dénaturation protéique et la stabilisation de la membrane des globules rouges humains (GRh). Une étude comparative les résultats obtenus par les tests *in vitro* avec ceux obtenus antérieurement *in vivo* sera abordée à la fin de cette partie.

Enfin nous avons terminé ce travail par une conclusion général.



Première partie

Recherche
Bibliographique

Chapitre I

L'acide salicylique et ses dérivés

I.1. L'acide salicylique

L'acide salicylique est un métabolite phénolique produit par les plantes [1], il est naturellement synthétisé par un certain nombre de plantes, on le trouve dans les fruits, sous forme estérifiée de salicylate de méthyle. Il peut agir comme un signal hormonal puissant pouvant déclencher la thermogenèse végétale [2]. C'est une molécule impliquée dans les phénomènes physiologiques végétaux, qui déclenchent des réponses de défense végétale, résistantes aux attaques fongiques, bactériennes ou virales.

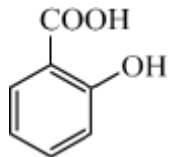
Il est utilisé comme médicament et comme précurseur de l'acide acétylsalicylique, l'aspirine.

I.1.1. Structure et dénomination

Chimiquement l'acide salicylique appartient à un groupe diversifié de composés phénoliques, qui possède un cycle aromatique avec un groupe hydroxyle ou ses dérivés fonctionnels.

C'est une petite molécule de 138,12 g/mol de poids moléculaire, peu soluble dans l'eau, mais soluble dans des solvants organiques (**tableau 1**).

Tableau 1 : Structure et dénomination de l'acide salicylique.

Structure	Formule brute	Nom Selon IUPAC	Synonymes
	$C_7H_6O_3$	Acide 2-Hydroxybenzoïque	Acide <i>o</i> -hydroxy benzoïque

A partir de l'acide salicylique, différents groupements peuvent être greffés : par exemple, le plus connu, l'acide acétylsalicylique, ou aspirine, est obtenue par estérification de la fonction hydroxyle de l'acide salicylique par l'anhydride acétique en milieu acide (**Figure 01**).

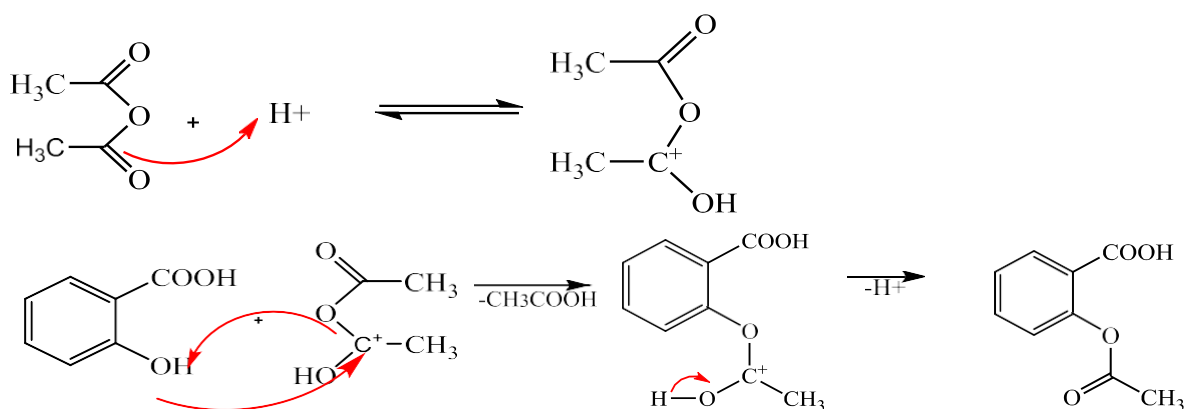


Figure 01 : Synthèse de l'aspirine [3].

Plusieurs groupements peuvent être greffés sur la fonction hydroxyle ou acide de l'AS, afin d'obtenir différents dérivés salicylés.

I.1.2. Propriétés physiques et chimiques

I.1.2.1. Propriétés physiques

L'acide salicylique est un acide o-hydroxy carboxylique aromatique et contrairement à ses isomères méta et para (Acides hydroxy carboxyliques, aromatiques), il dépend de la liaison hydrogène intramoléculaire et à la volatilité à la vapeur. Il se sublime également plus facilement que ses isomères, et est sensiblement plus acide : les constantes de dissociation des isomères méta et para sont respectivement $8,7 \times 10^{-5}$ et $3,3 \times 10^{-5}$.

L'acide salicylique est une poudre cristalline blanche, il se cristallise sous forme d'aiguilles incolores (eau) ou de prismes monocliniques [4].

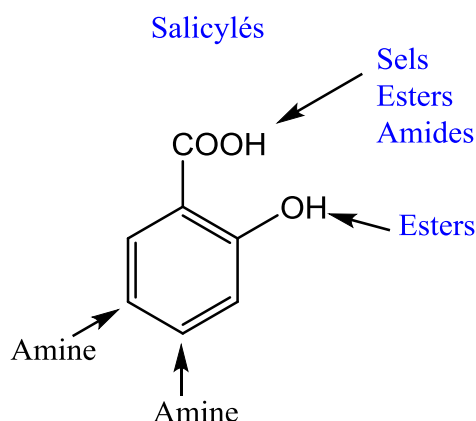
Le tableau 2 rassemble les propriétés physiques de l'AS :

Tableau 2 : Propriétés physiques d'AS.

Point de fusion	159°C
Point de sublimation	79°C
Température d'ébullition	211°C à 20 Torr
Densité	1,443
Masse volumique	1,443 g.cm ⁻³
Point d'éclair	157°C
L'indice de réfraction	1.565

I.1.2.2. Propriétés chimiques

La molécule de l'acide salicylique bifonctionnelle combine les propriétés des phénols avec celles des acides carboxyliques aromatiques (**tableau 3**).



L'AS est estérifié par les alcools en présence d'acides forts sans étherification significative [4].

Tableau 3 : Propriétés chimiques d'AS.

Formule brute	C ₇ H ₆ O ₃
Masse molaire	138,1207 g/mol
pKa	pKa1 :2,98 à 20 °C (acide carboxylique) pKa2 :13,6 (phénol)
pKa (para)	4.38
pKa (méta)	3.84

I.1.3. Historique

En 1828 Johann Buchner isolèrent la salicine, un glucoside d'alcool salicylique, à partir de l'écorce de saule, Le nom de l'acide salicylique (AS) a été donné par Raffaele Piria qui prépara l'acide salicylique à partir de la salicine en 1838. La production commerciale du AS synthétique a été débutée pour la première fois en 1874 en Allemagne. Finalement le brevet et la marque de l'aspirine ont été déposés par Bayer en 1899 sous la dénomination d'aspirine et est rapidement devenu le médicament le plus vendu dans le monde [2].

Depuis la découverte en 1990 de la production de l'acide salicylique d'un signal lors de l'établissement de la résistance systémique chez le concombre et le tabac, beaucoup d'efforts ont été déployés pour élucider le rôle de cette molécule dans cette résistance [5-6].

Par la suite, l'acide salicylique a été reconnu comme molécule de signalisation dans la défense des plantes contre divers agents pathogènes [7].

I.1.4. Biosynthèse de l'acide salicylique

L'acide salicylique est synthétisé par trois voies métaboliques, à partir de l'acide shikimique (**Figure 02**).

La première voie, également appelée voie de la phénylalanine, se produit dans le cytoplasme de la cellule, l'enzyme phénylalanine ammoniac lyase (PAL) convertit la phénylalanine (Phe) en acide trans-cinnamique (t-CA), qui est oxydé en acide benzoïque (BA). Ensuite, l'enzyme acide benzoïque-2-hydroxylase (BA2H) catalyse l'hydroxylation du cycle aromatique de l'AB et conduit à la formation de SA. La conversion enzymatique du BA en SA par la BA2H nécessite la présence de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ [8-9].

Les premières preuves de la première voie ont été données par Ellis et Amrhein [10], qui ont observé que l'alimentation de plantes de *Gaultheria procumbens* avec de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique marqués (¹⁴C) entraînait la production de SA marqué (¹⁴C). Par la suite, Yalpani et al. [11] et Silverman et al. [12], travaillant sur le riz et le tabac, ont proposé un mécanisme montrant que la chaîne latérale de l'acide trans-cinnamique soit décarboxylée pour générer de l'AB. Ensuite, l'AB est hydroxylée en position C2 pour former le SA. Cependant, des résultats récents indiquent que le benzoyl glucose, une forme conjuguée de l'AB, est plus susceptible d'être le précurseur direct du SA [9-11].

La deuxième voie est appelée voie de l'isochorismate (IC) et se produit dans le chloroplaste [13-14]. Dans les plantes, le chorismate est transformé en isochorismate puis en SA, une réaction qui est catalysée par deux enzymes : l'isochorismate synthase (ICS) et l'isochorismate pyruvate lyase (IPL). Dans la troisième voie, la biosynthèse du SA dans les plantes a été signalée à partir de l'acide shikimique via l'acide chorismique et l'acide comarique [15-16].

Les enzymes responsables des transformations sont indiquées en rouge. **ICS**, Isochorismate synthase ; **PAL**, phénylalanine ammonia-lyase ; **BA2H**, Benzoic acid 2-hydroxylase ; **IPL**, Isochorismate pyruvate lyase ; **CM**, Chorismate mutase.

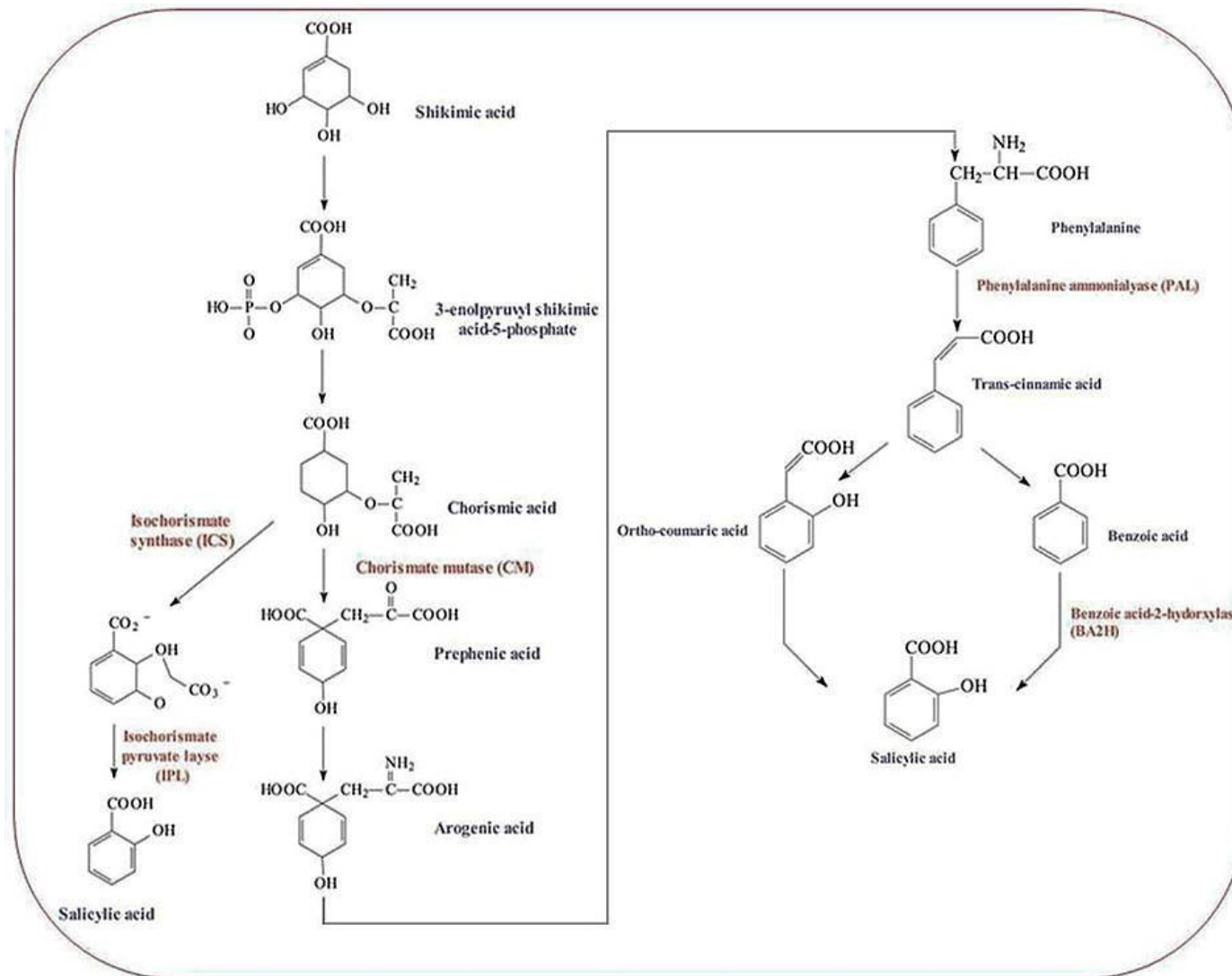


Figure 02 : Un modèle de voie de biosynthèse de l'acide salicylique à partir de l'acide shikmique et réalisé par trois voies différentes [16].

I.1.5. Mécanisme d'action

Les acides salicyliques agissent en inhibant les actions de l'enzyme cyclooxygénase (COX) comme les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (**Figure 03**).

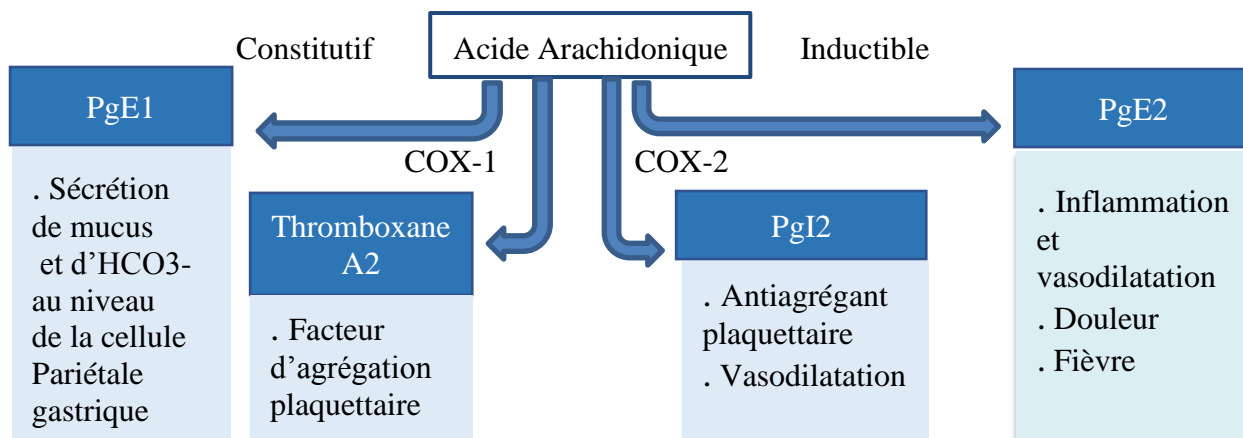


Figure 03 : Métabolites de l'acide arachidonique (AA).

L'acide salicylique module l'activité enzymatique de COX1 pour diminuer la formation de prostaglandines pro-inflammatoires. Le salicylate peut inhiber de manière compétitive la formation de prostaglandines. Les actions antirhumatismales (anti-inflammatoires non stéroïdiennes) du salicylate sont le résultat de ses mécanismes analgésiques et anti-inflammatoires [17].

L'acide salicylique agit en amenant les cellules de l'épiderme à se détacher plus facilement, en empêchant les pores de se boucher et en laissant de la place pour la croissance de nouvelles cellules. L'acide salicylique inhibe l'oxydation de l'uridine-5-diphosphoglucose (UDPG) de manière compétitive avec le nicotinamide adénosine dinucléotide (NAD) et de manière non compétitive avec l'UDPG. Il inhibe également de manière compétitive le transfert du groupe glucuronyl de l'acide uridine-5-phosphoglucuronique (UDPGA) vers l'accepteur phénolique [17].

L'action retardatrice de cicatrisation des salicylates est probablement due principalement à son action inhibitrice sur la synthèse des mucopolysaccharides [17].

I.1.6. Mode d'action de l'acide salicylique

Les mécanismes moléculaires par lesquels l'acide salicylique agit sur l'induction des gènes de résistance ont pu être en partie appréhendés grâce à l'utilisation d'analogues fonctionnels, en particulier l'acide 2,6-dichloroisonicotinique qui mine son action comme

messenger intracellulaire. L'acide salicylique apparaît donc comme un signal qui est à l'origine d'une cascade de transduction intracellulaire aboutissant à l'expression de nombreux gènes [18].

Dans la plupart des cas étudiés, la présence d'acide salicylique reste indispensable aux endroits où s'exprime la SAR (Systemic Acquired Resistance), qu'il provienne du transport phloémien ou d'une biosynthèse directe au niveau de ces organes cibles. Par opposition, certains exemples montrent cependant l'existence de voies de transduction indépendantes de l'acide salicylique, dans lesquelles l'éthylène et l'acide jasmonique joueraient le rôle essentiel pour l'expression des mécanismes biochimiques de résistance [19].

I.1.7. Synthèse de l'acide salicylique

L'acide salicylique répond à la formule $C_6H_4(OH)COOH$, où le groupe OH est orthopar rapport au groupe carboxyle. Il est également connu sous le nom d'acide 2-hydroxybenzoïque. Il est peu soluble dans l'eau (2 g / l à 20 ° C) [20].

Il existe plusieurs méthodes de synthèse :

✚ Synthèse de Kolbe-Schmitt

Une méthode connue sous le nom de réaction de Kolbe-Schmitt. L'acidification du produit avec de l'acide sulfurique donne de l'acide salicylique (**Schéma 01**)

Le salicylate de sodium est préparé dans le commerce en traitant le phénolate de sodium avec du dioxyde de carbone à haute pression (100 atm) et à haute température (115°C) [20].

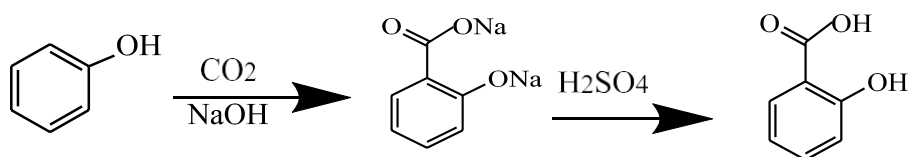


Schéma 01 : Synthèse de Kolbe-Schmitt.

✚ Mécanisme de réaction

La réaction de Kolbe – Schmitt se déroule via l'addition nucléophile, phénolate classiquement phénolate de sodium (NaOC_6H_5), au dioxyde de carbone pour donner le salicylate. La dernière étape est la réaction du salicylate avec de l'acide pour former l'acide salicylique souhaité (**Schéma 02**) [21].

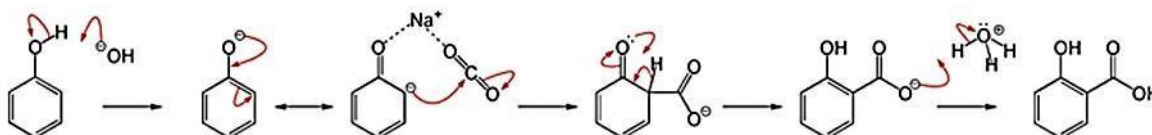
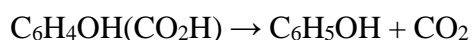


Schéma 02 : Mécanisme de la réaction de Kolbe-Schmitt.

Il peut également être préparé par hydrolyse de l'aspirine (acide acétylsalicylique) ou du salicylate de méthyle (huile de gaulthérie) avec un acide ou une base forte [22].

L'acide salicylique se dégrade en phénol et en dioxyde de carbone entre 200 et 230°C [23].



I.1.8. Rôle physiologique de l'acide salicylique

L'AS exerce un rôle dans des phénomènes physiologiques comme la photosynthèse, la floraison, la perméabilité de la membrane, la production de chaleur, la croissance et développement des plantes, et les interactions plantes – pathogènes [2-10].

Il a été impliqué notamment dans le phénomène de SAR (C'est une réponse de résistance généralisée à la plante, déclenché par une molécule chimique) où une plante devient résistante vis-à-vis d'un grand nombre d'agents pathogènes différents suite à une attaque locale par un microorganisme à virulent. L'application exogène d'AS peut protéger les plantes contre certains pathogènes et activer l'expression d'un groupe de gènes associés à la défense comme les gènes des protéines PRs lesquelles sont aussi induites dans les plantes infectées [24].

Une étude récente montre que l'implication du SA dans l'immunité des plantes est liée à 3 fonctions :

- L'AS est une molécule mobile capable d'intervenir dans la chaîne de perception, amplification et transmission de l'information quand une cellule de la plante est attaquée par un agent pathogène, ceci mène à l'expression de gènes de défense

responsables de la protection structurale et fonctionnelle [25]. L'AS migre dans les vaisseaux de la plante, et confère une immunité à distance aux tissus de la plante dans la SAR [2].

- L'AS est impliqué (avec le peroxyde d'hydrogène, oxyde de nitrogène et d'autres composés) dans la fonction de plusieurs systèmes signal, et les unifie vers un réseau d'interactions régulatrices [26].
- La capacité du SA d'inhiber l'activité de la catalase (enzyme qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène) mène à une augmentation des taux de peroxyde d'hydrogène in vivo et induit un choc oxydatif aux sites de l'attaque par le pathogène ou du traitement avec un éliciteur [27]. Des similarités structurales entre SA et H₂O₂ sont à la base de la liaison et inhibition de la catalase par l'AS.

I.2. Molécules et spécialités dérivées de l'acide salicylique

Plusieurs modifications structurales peuvent être apportées sur l'acide salicylique afin d'obtenir des dérivés salicylés aboutissant aux divers effets pharmacologiques (**Figure 04**).

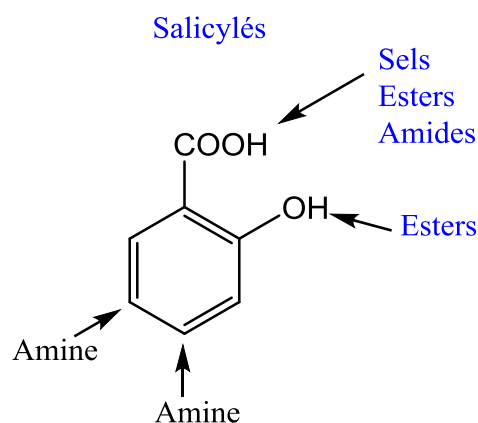


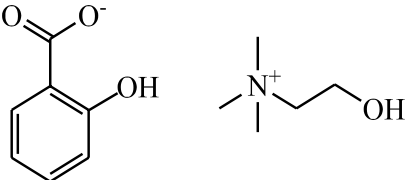
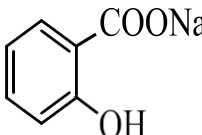
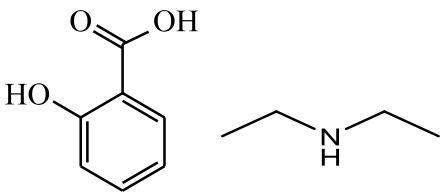
Figure 04 : Modifications structurales possibles de l'AS.

I.2.1. Modifications via la fonction acide

Formation de sels

Le groupe carboxyle de l'acide salicylique est facilement converti en sels par l'action des carbonates métalliques. Afin d'éviter la décoloration, les solutions aqueuses de sel doivent être conservées légèrement acides. Les sels sont obtenus sous forme solide en concentrant leurs solutions aqueuses (**tableau 4**).

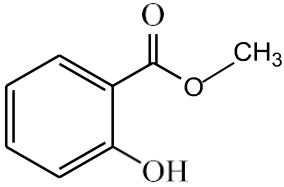
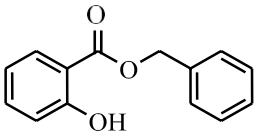
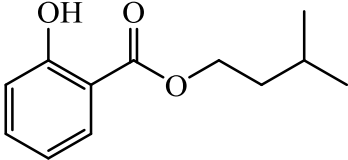
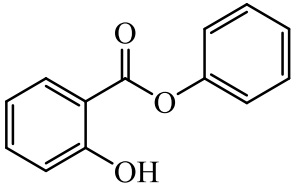
Tableau 4 : Formation de sels carboxylates.

Structure et formule	Description	Utilisation
Le salicylate de choline 	Ce composé appartient à la classe des composés organiques appelés acides salicyliques. Ce sont des acides benzoïques ortho-hydroxylés.	utilisé comme analgésique, antipyrétique et antirhumatismal. Il soulage les douleurs légères à modérées [28].
Le salicylate de sodium 	Forme des paillettes cristallines blanches, inodores et brillantes.	utilisé comme analgésique, antipyrétique et antinévralgique [29].
Le salicylate de di-éthylamine 	Le salicylate de diéthylamine est un sel d'acide salicylique.	Agent analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire [28].

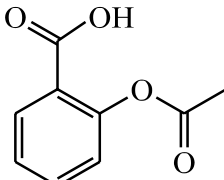
Formation d'esters de la fonction acide

Plusieurs esters de salicylate importants sont décrits ci-dessous. Ils sont formés par réaction avec les alcools appropriés en utilisant un acide minéral fort tel que l'acide sulfurique comme catalyseur. Tous sont solubles à la fois dans l'éther et l'alcool, mais n'est que peu soluble dans l'eau (tableau 5).

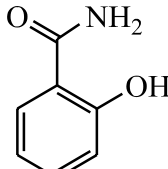
Tableau 5 : Formation d'esters de la fonction acide.

Structure et formule	Description	Utilisation
Le salicylate de méthyle 	Un liquide huileux incolore avec une odeur caractéristique.	utilisé comme insecticide, écran solaire, parfum et intermédiaire synthétique [30].
Le salicylate de benzyle 	Un liquide clair ou incolore à opaque.	utilisé comme additif dans les savons, les détergents et les produits de parfumerie (alcool benzylique) [28].
Le salicylate d'iso amyle 	Un liquide incolore au parfum d'orchidée.	Le salicylate d'iso amyle est utilisé comme parfum et stabilisateur en parfumerie et comme agent antirhumatismal (application topique) [29].
Le salicylate de phényle (Le salol) 	Une poudre cristalline incolore.	utilisé comme antiseptique, comme agent de conservation, comme écran solaire et comme agent photo protecteur général pour les produits synthétiques, ainsi que comme émollient [30].

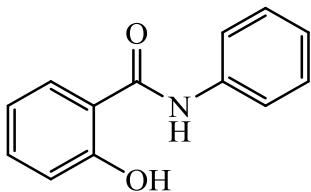
Formation d'esters de la fonction alcool .

<p>Acide acétylsalicylique (Aspirine)</p> 	<p>Isolé sous forme d'aiguilles monocliniques incolores ou de poudre cristalline (à partir d'eau), ou sous forme de plaquettes plates (à partir d'alcool iso amylique).</p>	<p>utilisé comme agent antipyrétique, analgésique et anti-inflammatoire, et il a un effet antirhumatismal. L'acide acétylsalicylique a également des propriétés anti thrombotiques et anticoagulantes [30].</p>
---	---	---

Formation d'amides

<p>Le salicylamide</p> 	<p>Est une poudre cristalline blanche.</p>	<p>Le salicylamide est utilisé comme analgésique, antipyrétique, antirhumatismal, sédatif et fongicide [30].</p>
---	--	--

Autres

<p>Salicylanilide</p> 	<p>Forme des cristaux incolores et inodores.</p>	<p>Le salicylanilide et notamment ses dérivés sont des fongicides puissants, et sont utilisés dans la synthèse de teintures, de colorants, de laques et de textiles, ainsi que comme désinfectant [29].</p>
---	--	---

I.3. Pharmaco-toxicologie

L'acide salicylique et ses dérivés sont résorbés par la peau et les muqueuses. Les esters de l'acide salicylique se dissocient par hydrolyse sous l'influence des estérases. Selon le pH de l'urine, l'acide salicylique est soit oxydé en acide gentisique, soit éliminé par les reins sous forme d'acide salicylurétique ou de glucuronide salicylate. Le taux d'élimination de l'acide salicylique étant inférieur au taux de résorption, il existe dans certains cas un risque d'accumulation dans l'organisme.

L'acide salicylique a une activité kératolytique et un irritant tissulaire. Dans l'estomac, cette action irritante affecte principalement les cellules productrices de mucus et les cellules striées. Un traitement à long terme par l'acide salicylique ralentit le taux de coagulation du sang en réduisant l'agrégation des plaquettes. La biosynthèse des prostaglandines est également inhibée par l'acide salicylique et ses dérivés, ce qui explique en partie leur action anti-inflammatoire.

L'acide et ses dérivés présentent des effets antipyrétiques et analgésiques, et sont des fongicides et des agents bactériostatiques [31].

Les symptômes d'hypersensibilité cutanée et pulmonaire aux salicylates sont bien connus, mais il apparaît que ces réactions ne sont pas toujours le résultat d'une véritable allergie. Une diminution de la synthèse des prostaglandines et, par conséquent, d'autres médiateurs biologiquement actifs est manifestement impliquée ici aussi. Une sensibilisation croisée a été établie, par exemple, entre le salicylate de méthyle et l'acide acétylsalicylique [32].

Chapitre II

L'inflammation

II.1. L'inflammation

1.1. Généralités sur la réaction inflammatoire

1.1.1. Définition

L'inflammation ou la réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants vascularisés à une agression par une infection pathogène, ou par un traumatisme.

Cette réaction inflammatoire est habituellement bénéfique, son but étant d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de la persistance de l'agent pathogène dans le siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoires [33].

1.1.2. Symptômes

Il existe des différents symptômes d'inflammation :

- Les symptômes locaux (rougeur, chaleur, tumeur, douleur).
- Les symptômes généraux (fièvre, asthénie, anorexie, myalgies, torpeur [34]).

1.1.3. Les causes de l'inflammation

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et représentent les agents pathogènes d'origine biologique, les agents physiques et les agents chimiques. Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation [35] :

- **L'infection par des agents pathogènes** : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons).
- **Les agents physiques** : chaleur, froid, traumatisme et les irradiations par les rayons UV.
- **Les agents chimiques** : caustiques, toxines, venins.

1.1.4. Types d'inflammation

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoires :

❖ Inflammation aigüe

C'est une réponse immédiate à un agent agresseur qui se définit comme une série de réactions qui peuvent survenir dans les premières heures suivant la blessure. Elle dure de quelques jours à quelques semaines [36]. Et peut être divisée en trois grandes phases :

- **Phase vasculaire** : Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes, caractérisée par des modifications de la microcirculation.
- **Phase cellulaire** : Elle se caractérise par la formation du granulome inflammatoire [37]. Successive à la mobilisation de plusieurs cellules, cette mobilisation va faciliter de destruction des micro-organismes, et d'élimination des tissus lésés.
- **Phase de résolution** : est à l'origine de la réparation tissulaire. Après un séjour de 24 à 48 heures.

❖ Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une réponse prolongée qui implique la destruction de tissu, n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années [38].

1.1.5. Les médiateurs de l'inflammation

Les inducteurs de l'inflammation déclenchent la production de nombreux médiateurs inflammatoires par les cellules du système immunitaires, qui changent à leur tour le fonctionnement de beaucoup de tissus et organes (**tableau 6**) [39].

Tableau 6 : Quelques médiateurs de la réaction inflammatoire [40-41-42].

Médiateurs	Rôles
Histamine	Augmente la perméabilité vasculaire, permet la contraction des muscles lisses, provoque la sensation de douleur.
Prostaglandines	Provoquent la vasodilatation, participent à la formation de l'œdème et sont responsables de la douleur.

Cytokines (TNF, IL-1, IL-6)	Localement : Activation endothéliale (expression de molécules d'adhésion) Systémique : Fièvre, problèmes métaboliques, Hypotension.
--------------------------------	--

1.2. Les anti-inflammatoires

Le terme anti-inflammatoire stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens et connue comme traitement actuel de l'inflammation. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long terme [43].

1.2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens (corticoïdes)

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une grande famille de médicaments dérivés du cortisol synthétisé par les glandes surrénales. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, ils inhibent l'action de phospholipase A2 responsable de la synthèse des prostaglandines à partir du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclo-oxygénase (**Figure 05**) [44]. Parmi ces AIS on a prednisolone, bétaméthasone (**Figure 06**).

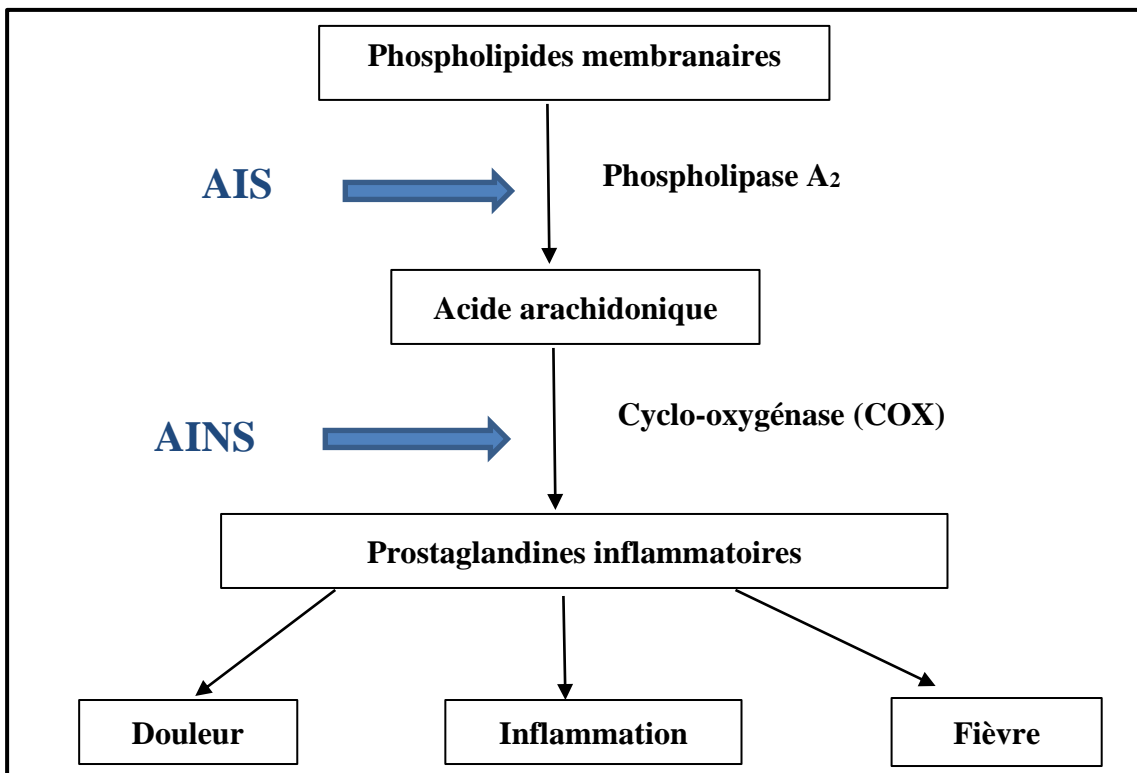


Figure 05 : Inhibition de l'enzyme cyclo-oxygénase (COX).

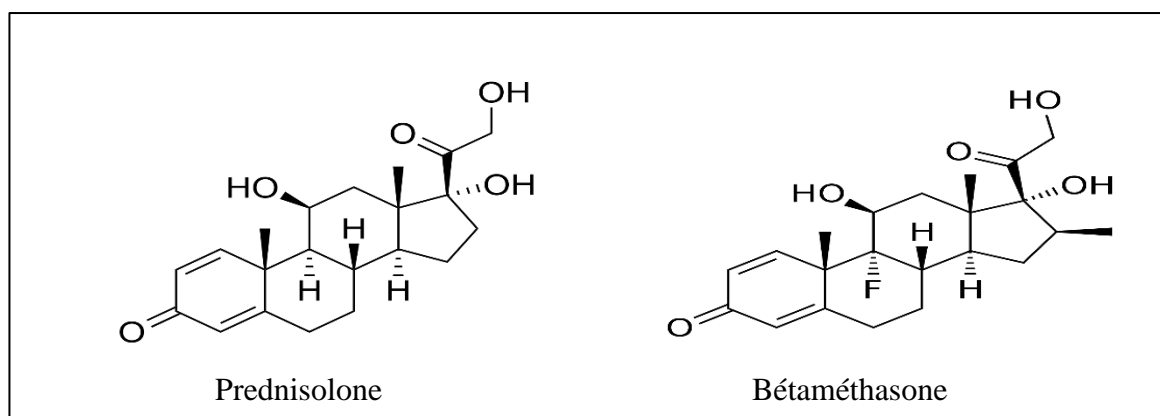


Figure 06 : Structures chimiques de quelques anti-inflammatoires stéroïdien.

1.2.1.1. Mécanisme d'actions des AIS

Les anti-inflammatoires stéroïdiens agissent en inhibant la réaction inflammatoire par l'inactivation de la phospholipase membranaire, ils empêchent la libération de l'acide arachidonique précurseur des prostaglandines et ils induisent la formation d'une protéine appelée lipocortine qui se fixe sur la phospholipase et la rend inactive [45].

1.2.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) regroupent l'ensemble des médicaments qui présentent différentes activités pharmacologiques de type anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique et antiplaquettaire ainsi que des effets secondaires gastro intestinaux et rénaux. Qui inhibent la synthèse des prostaglandines par l'inhibition spécifique de deux cyclo-oxygénases, la COX-1 et la COX-2. Parmi ces AINS on a l'aspirine (inhibe plus la COX-1 que la COX-2), diclofénac et piroxicam (Figure 07) [46].

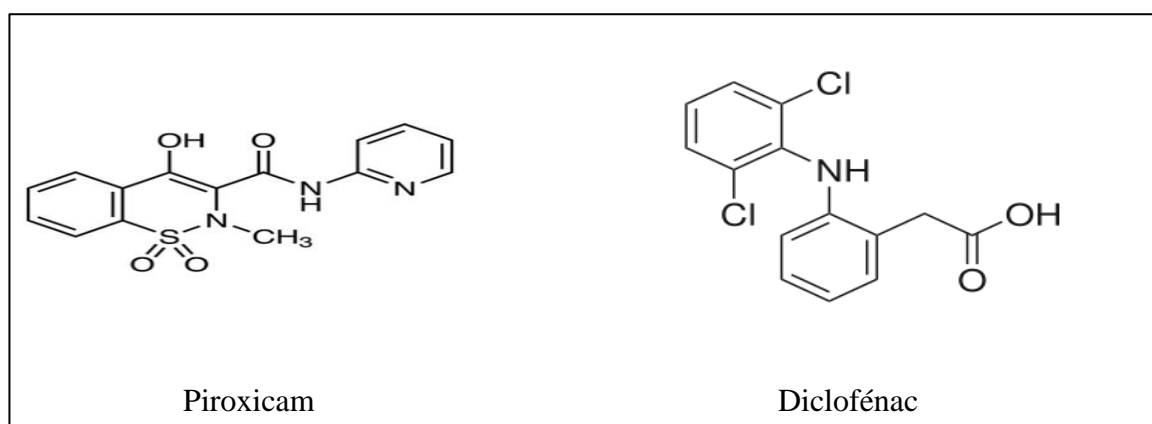


Figure 07 : Structure chimique de certains AINS.

Les AINS d'une manière générale, sont des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase. Il y a deux isoformes de COX :

COX-1 : c'est l'isoforme constitutive, présente dans la plupart des tissus de l'organisme. Elle est impliquée dans la production de prostaglandines (PGs) à fonctions protectrices au niveau vasculaire (plaquettes sanguines, cellules endothéliales), au niveau de l'estomac et au niveau rénal [47].

COX-2 : elle est principalement induite lors des phénomènes inflammatoires. Elle peut aussi exprimée constitutivement par certains tissus tels que le rein et le cerveau.

1.2.2.1. Mécanisme d'action des AINS

Les mécanismes d'action restent encore imparfaitement connus, mais on sait que les AINS :

- Diminuent la production de radicaux libres responsables des lésions tissulaires du foyer inflammatoire.
- Le mécanisme d'action principal des AINS est une inhibition de la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, par un blocage de la cyclo-oxygénase (COX1 et COX 2), tandis qu'une partie de la cascade de l'acide arachidonique peut se poursuivre par la voie de la lipoxygénase.
- Les prostaglandines produites par la COX-1 jouent surtout un rôle physiologique (en particulier la protection gastrique), alors que celles produites par la COX-2 sont surtout produites dans des conditions inflammatoires [48].
- La première enzyme intervenant dans la biotransformation de l'acide arachidonique est la prostaglandine H synthase. Cette enzyme est présente sous deux isoformes : la cyclooxygénase-1 appelée COX-1 et la cyclooxygénase-2 ou COX-2. Dans un premier temps, les COX assurent une activité dioxygénasique sur l'acide arachidonique, permettant ainsi son oxydation et sa transformation en prostaglandines G2 (PGG2). Dans un second temps, les COX assurent une activité peroxydasique provoquant la réduction de la PGG2 en prostaglandine H2 (PGH2) [47].
- Les PGG2 et PGH2 sont transformées en PGI2 (prostacyclines) par la prostacycline synthase, en TXA2 (thromboxanes) par le thromboxane synthase, et en PGE2 (prostaglandines série E), en PGF2 α (prostaglandines série F α) ou en PGD2 (prostaglandines série D) (**Figure 08**) [47].

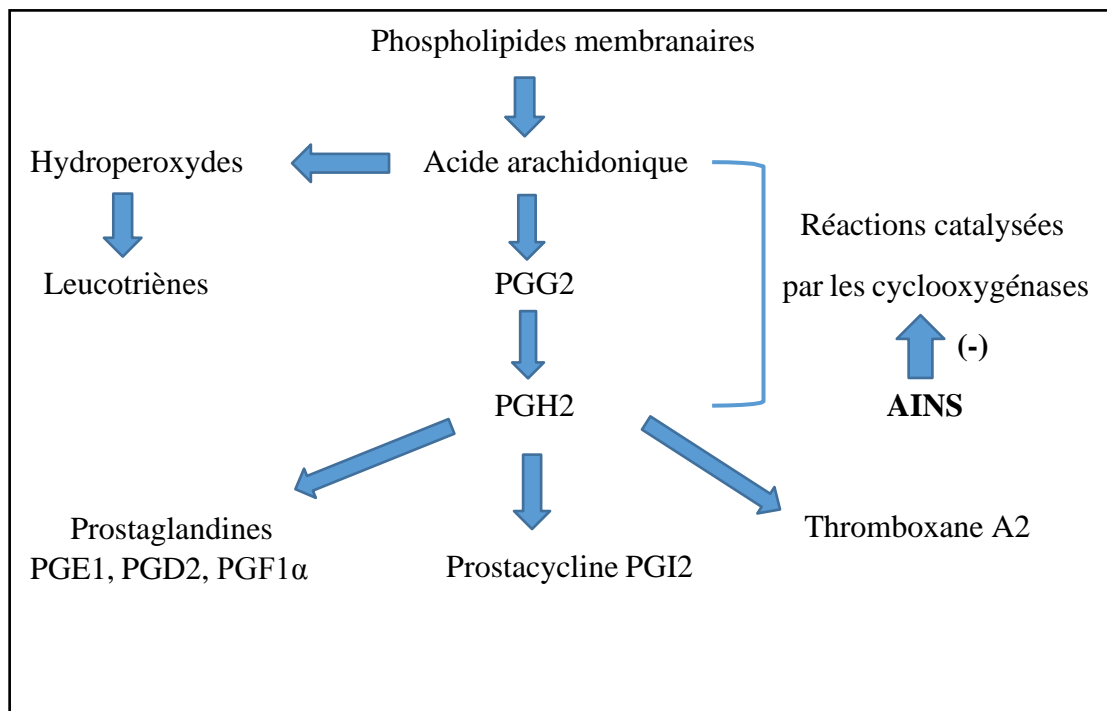


Figure 08 : Mécanisme d'action des AINS [49].

1.3. Classification des AINS

Les AINS regroupent l'ensemble des médicaments symptomatiques inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines. La diminution de la synthèse des prostaglandines par les AINS est consécutive à l'inhibition plus ou moins sélective des isoenzymes de la COX. On peut classer les AINS selon leur famille chimique (**tableau 7**) et selon leur sélectivité d'action anti-COX (**tableau 8**).

Tableau 7 : Classification chimique simplifiée des AINS [50].

	Familles chimiques	DCI
NON –SELECTIFS (CLASSIQUES)	Salicylés	Acide acétylsalicylique Salicylate de sodium Acétylsalicylate de lysine (aspégic)
	Propioniques	Ibuprofène Fénoprofène Naproxène Kétoprofène Carprofène

	Fénamates	Acide niflumique Acide méfénamique
	Arylacétates	Diclofénac
	Indoliques	Indométacine Sulindac
	Oxicams	Piroxicam Méloxicam Tenoxicam
	Pyrazoles	Phénylbutazone
	Sulfonilides	Nimésulide
SELECTIFS (COXIBS)	Inhibiteurs sélectifs de la cox-2	Célécoxib

Tableau 8 : Classification des principaux AINS selon leur sélectivité d'action anti COX [51].

Groupe	AINS
Anti-COX-1 préférentiel	Aspirine Indométacine
Anti-COX non sélectif	Diclofénac Ibuprofène
Anti-COX-2 préférentiel	Méloxicam Nimésulide
Anti-COX-2 sélectif	Célécoxib Rofécoxib

1.4. Les effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens

- ✚ **Effet analgésique** : L'action analgésique des AINS s'exerce à la fois au niveau périphérique et au niveau central, mais l'effet périphérique prédomine, leur effet analgésique est habituellement associé à leur effet anti-inflammatoire et résulte de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines dans les tissus inflammés [45].
- ✚ **Effet antipyrétique** : Qui est susceptible d'abaisser la température jusqu'à des valeurs proches de la normale en cas de fièvre [52].

✚ **Effet anti-inflammatoire** : Le rôle des prostaglandines dans l'inflammation est de produire une vasodilatation et d'augmenter la perméabilité vasculaire. L'effet anti-inflammatoire relativement modeste des AINS donnés à la plupart des patients présentant une arthrite rhumatoïde, soulage par fois la douleur, la raideur et le gonflement, mais ne modifie pas la cause de la maladie [45].

1.5. L'acide acétylsalicylique (Aspirine)

1.5.1. Présentation de la molécule l'aspirine

Aspirine est le nom commercial qui désigne un médicament dont le principe actif est l'acide acétylsalicylique. L'aspirine est un médicament dont le brevet est déposé par la société Bayer en 1899 [53].

Le nom chimique de cette molécule est l'acide 2-(acétyloxy) benzoïque (**Figure 09**).

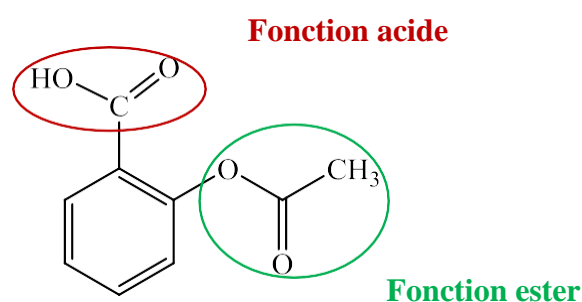


Figure 09 : Formule semi-développée de L'AAS (Aspirine).

1.5.2. Passage à l'aspirine

L'acide salicylique est traité par l'anhydride acétique à une température voisine de 90°C dans un milieu acide (H₂SO₄). Après 2 heures de traitement, le mélange obtenu est filtré pour éliminer l'acide salicylique n'ayant pas réagi et le filtrat est laissé précipiter, par refroidissement vers 0°C. L'ester acétique de l'acide salicylique ou aspirine sous forme d'un solide blanc est filtré puis recristallisé (**Schéma 03**).

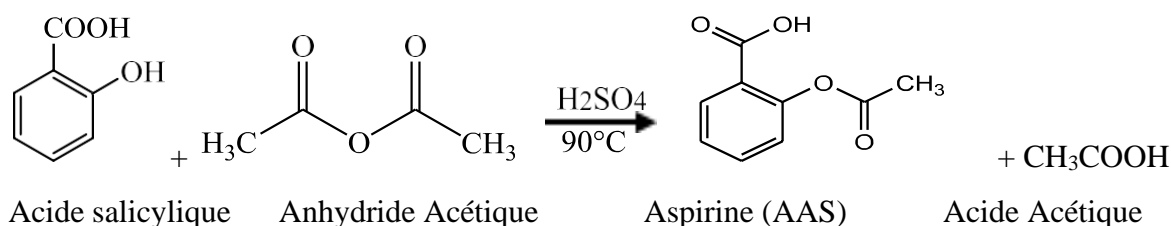


Schéma 03 : Réaction de synthèse de l'aspirine (réaction d'estérification).

1.5.3. Mode d'action

L'aspirine inhibe l'action des cyclo-oxygénases 1 et 2, ce qui empêche la production de prostaglandines, responsables du message douloureux [54]. Ce mécanisme d'action est également à l'origine des effets indésirables du produit. En effet, la cyclooxygénase présente au moins 2 isoformes :

La COX-1 est l'isoforme constitutive. Elle a des fonctions physiologiques. Lorsqu'elle est activée, elle entraîne la production de prostacyclines qui ont une action anti-thrombogène quand elles sont relarguées au niveau de l'endothélium et une action cytoprotective quand elles se trouvent au niveau de la muqueuse gastrique. Son inhibition est donc responsable des effets indésirables de l'aspirine notamment de sa toxicité gastro-intestinale et rénale.

La COX-2 est l'isoforme inducible. Elle n'est présente que faiblement à l'état physiologique. Elle est induite par les stimuli inflammatoires ou par la présence de cytokines circulantes dans les autres cellules. Son inhibition permet donc l'action anti-inflammatoire de l'aspirine (Figure 10).

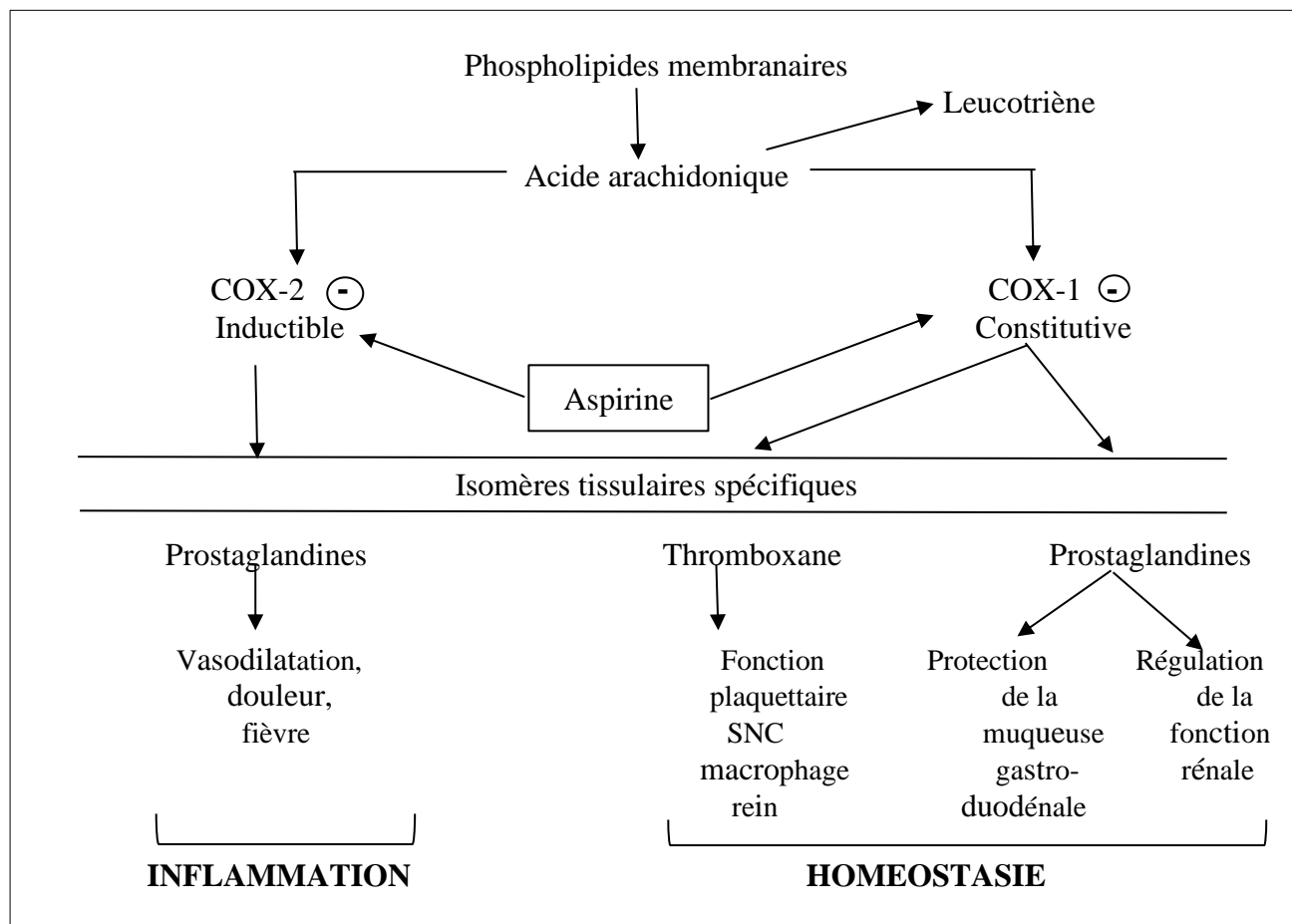


Figure 10 : Mode d'action de l'aspirine [55].



Deuxième partie

Partie
Expérimentale

Chapitre III

Matériels et Méthodes

III.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'objectif principal du présent travail consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des dérivés de l'acide salicylique par deux méthodes, à savoir : la dénaturation des protéines (albumine sérique bovine BSA) et la stabilisation membranaire HRBC basé sur le calcul du pourcentage d'inhibition et la comparaison des résultats obtenus avec des résultats obtenus antérieure *in vivo* sur les mêmes composés [56].

Cette étude a été réalisée au niveau de laboratoire de pharmacologie et de phytochimie (LPP) à la faculté des sciences exactes et informatiques de l'université de Jijel.

III.2. Généralité sur les composés étudiés

Deux séries des dérivés de l'acide salicylique portant une fonction urée ou amide ont été testées sur leur activité anti-inflammatoire *in vitro*. Les schémas de synthèse de ces dérivés sont représentés ci-dessous [57].

III.2.1. Voie de synthèse de la série 01

Le schéma global de la synthèse de cette série des molécules est le suivant (**Schéma 04**) :

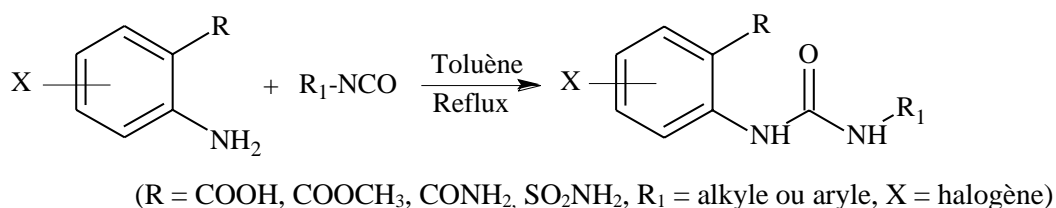


Schéma 04 : Schéma de synthèse des molécules de la série 01.

Les molécules de la série 01 sont : HK15, K10, K104, K105, K110, K112, K113, K114, K115, K116, K119, K120, K121, K122 et K123.

✚ Mécanisme générale de la réaction

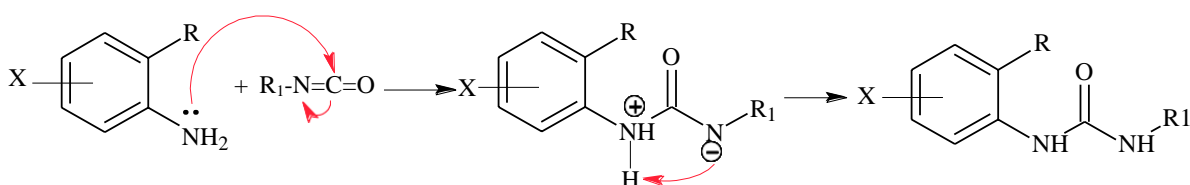
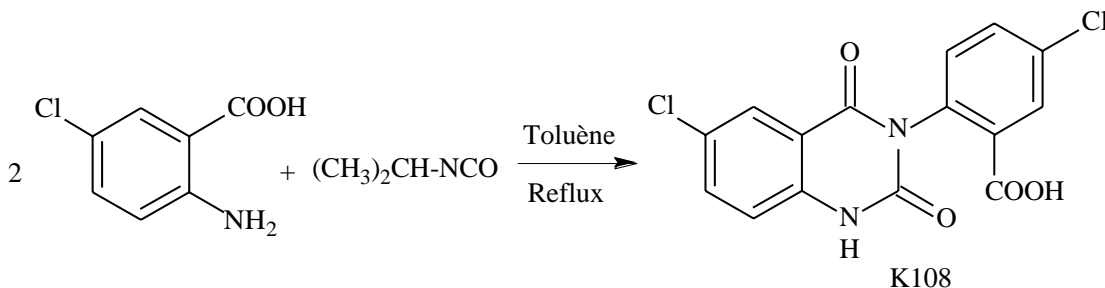


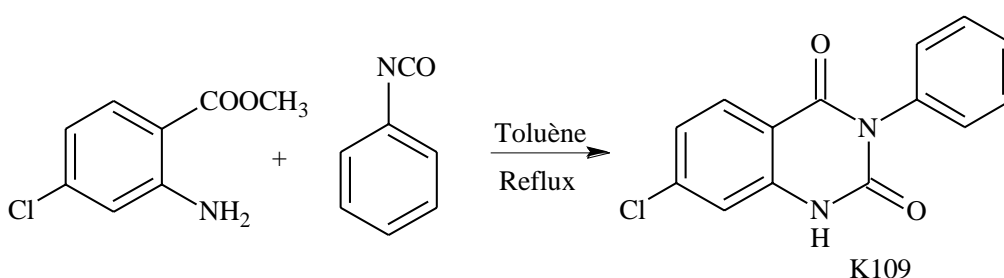
Schéma 05 : Mécanisme général de la réaction.

Cette réaction donne dans certains cas des produits cyclisés comme dans les réactions suivantes :

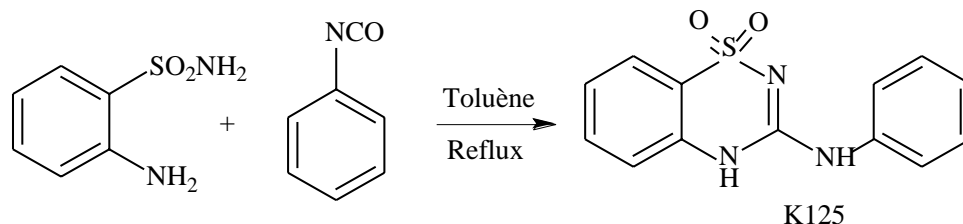
Obtention de **K108**



Obtention de **K109**

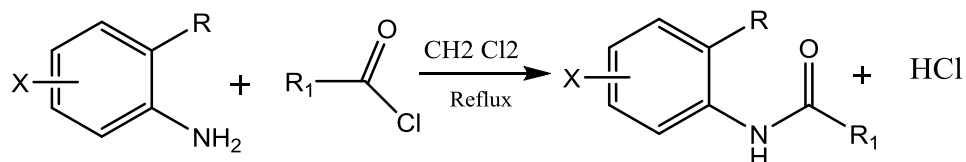


Obtention de **K125**



III.2.2. Voie de synthèse de la série 02

Dans cette série une fonction amide a été fixée à partir des analogues de l'acide salicylique par réaction avec les chlorures d'acyle. Ce sont des réactions rapides et ne nécessite pas beaucoup d'énergie, donc elles se font dans un solvant à reflux comme le dichlorométhane (**Schéma 06**).



(R = COOH, COOCH₃, CONH₂, SO₂NH₂, R₁ = alkyle ou aryle, X = halogène)

Schéma 06 : Schéma de synthèse des molécules de la série 02.

Les molécules de la série 02 sont : K126, b2, b3, b6, b7, b10, b11, b12 et b15.

✚ Mécanisme général de la réaction

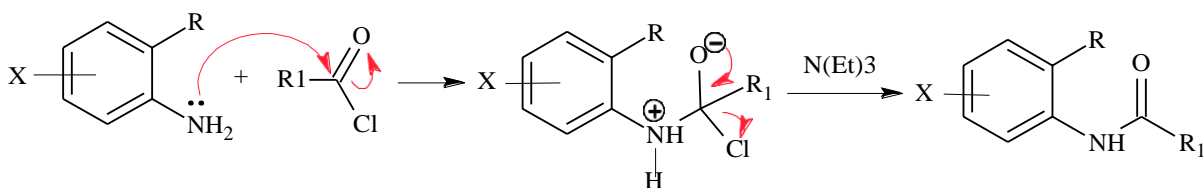
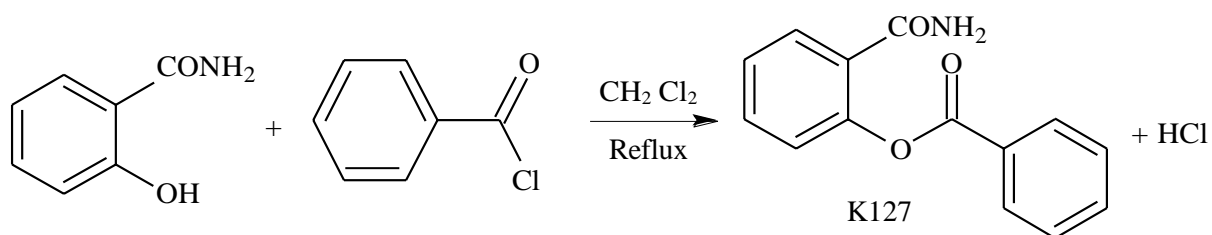


Schéma 07 : Mécanisme général de la réaction.

Lorsque le NH₂ a été remplacé par OH en position 2, nous avons obtenu le composé **K127**



III.3. Matériels et méthodes

III.3.1. Matériels

Les différents appareils, réactifs et solvants utilisés pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* sont regroupés dans le tableau 09 pour le test d'inhibition de la dénaturation des protéines et le tableau 10 pour le test de stabilisation membranaire des globules rouges :

Tableau 9 : Matériel et réactifs d'Inhibition de dénaturation des protéines.

Matériels	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> - Incubateurs - Balance analytique - Spectrophotomètre (SHIMADZU UV mini 1240) 	<ul style="list-style-type: none"> - BSA (Bovin Serum Albumin) - Diclofénac du sodium - Tampon phosphate (pH 6,3) - HCl - L'eau distillée

Tableau 10 : Matériels et réactifs de Stabilisation membranaire des globules rouges.

Matériels	Réactifs	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> - Tubes EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) - Incubateurs - Balance analytique - Centrifugeuse à chaud - Spectrophotomètre - Cuve de quartz 	<ul style="list-style-type: none"> - Acide citrique - Citrate de sodium - Glucose - NaCl - NaOH - NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄ 	<ul style="list-style-type: none"> - Sang humain - Solution d'Alsevers (2% de dextrose, 0,8% de citrate de sodium, 0,05% d'acide citrique et 0,42% de NaCl dans de l'eau distillée) - Solution hyposaline (0,36% NaCl) - Tampon phosphate de sodium (pH 7,4) - Solution isosaline (0,85%, pH 7,2) - HRBC (globules rouges humains)

III.3.2. Méthodes

Deux méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des dérivés d'acide salicylique à tester. Ce sont la méthode de l'inhibition de la dénaturation des protéines en utilisant l'albumine sérum bovin (BSA) comme modèle et la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).

➤ Méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains

Principe

La méthode HRBC a été utilisée pour l'estimation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*. Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des composés à empêcher l'hémolyse des globules rouges humaine (GR), induite par l'hypotonie et la chaleur et donc prévenir la libération de l'hémoglobine. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par (Sadique *et al.*, 1989 ; Oyedapo *et al.*, 2004) [58]. Le sang a été prélevé chez un donneur humain en bonne santé ne consommant aucun médicament stéroïdien depuis deux semaines. Le sang a été soumis à une centrifugation et le surnageant a été soigneusement pipeté à l'aide d'une pipette stérile. Les cellules emballées ont été remises en suspension avec un volume égal de sérum physiologique normal (pH 7,4) et centrifugés à nouveau. Le processus a été répété quatre fois jusqu'à ce que les surnageant seront clairs [59].

- **Mode opératoire**

1/ Préparation de la suspension des globules rouges humains (HRBC)

Le sang recueilli sur des volontaires sains a été mélangé avec un volume égal de solution d'Alsevers stérilisée (2 % de glucose, 0,8 % de citrate de sodium, 0,5 % d'acide citrique et 0,42 % de chlorure de sodium dans de l'eau). Cette solution sanguine a été centrifugée à 3000 tr/min pendant 10 min et les cellules concentrées ont été séparées. Les cellules garnies ont été lavées avec une solution isosaline (0,85 %, pH = 7,2) et une suspension à 10 % v/v a été préparée avec de l'isosaline [60].

Le protocole de cette préparation est résumé dans la figure 11.

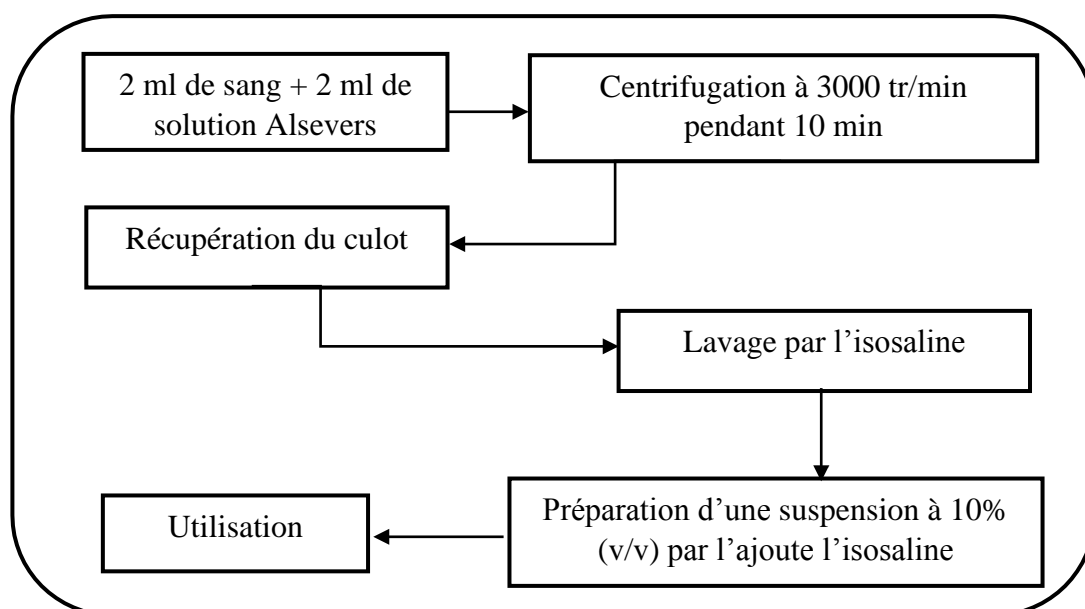


Figure 11 : Protocole de préparation de la suspension [60].

2/ Dosage de l'activité de stabilisation de la membrane

L'activité anti inflammatoire *in vitro* des composés a été effectuée selon la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains, les solutions suivantes ont été utilisées [60-61].

- ✚ **La solution d'essai** : composé de 1 ml tampon phosphate (pH=7,4 ; 0,15M), 2 ml solution hyposaline (0,36%). 0,5 ml de produit à tester a même concentration 1000 µg / ml et 0,5 ml de suspension de globules rouges préparé à 10 %.

- ✚ **Le test de contrôle** : composé de 1 ml de tampon phosphate et 2,5 ml d'eau physiologie et 0,5 ml de suspension de globules rouges humains 10% v/v.
- ✚ **La Solution standard** : L'acide acétylsalicylique (Aspirine) est utilisé comme un standard. Il est composé de 1 ml de tampon phosphate, 2 ml de solution hyposaline et 0,5 ml d'aspirine a la même concentration 1000 µg / ml et 0,5 ml de suspension de globules rouges humains à 10%.

Tous les mélanges d'essai ont été incubés à 37°C pendant 30 min. puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 20 min (**Figure 10**).

Le liquide surnageant a été séparé et la teneur en hémoglobine a été estimée par un spectrophotomètre à 560 nm. Le pourcentage d'hémolyse a été estimé en supposant que l'hémolyse produite dans le contenu était 100 % [61].

L'aspirine est utilisée comme molécule de traitement anti-inflammatoire, avec la même concentration que les produits à tester.

Le pourcentage de stabilisation ou de protection de la membrane HRBC a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [(Ac - At) / Ac] * 100$$

Ac : absorbance de control

At : absorbance de l'échantillon (test)

Le Protocole de stabilisation membranaire (HRBC) est schématisé dans les figures 12,13.

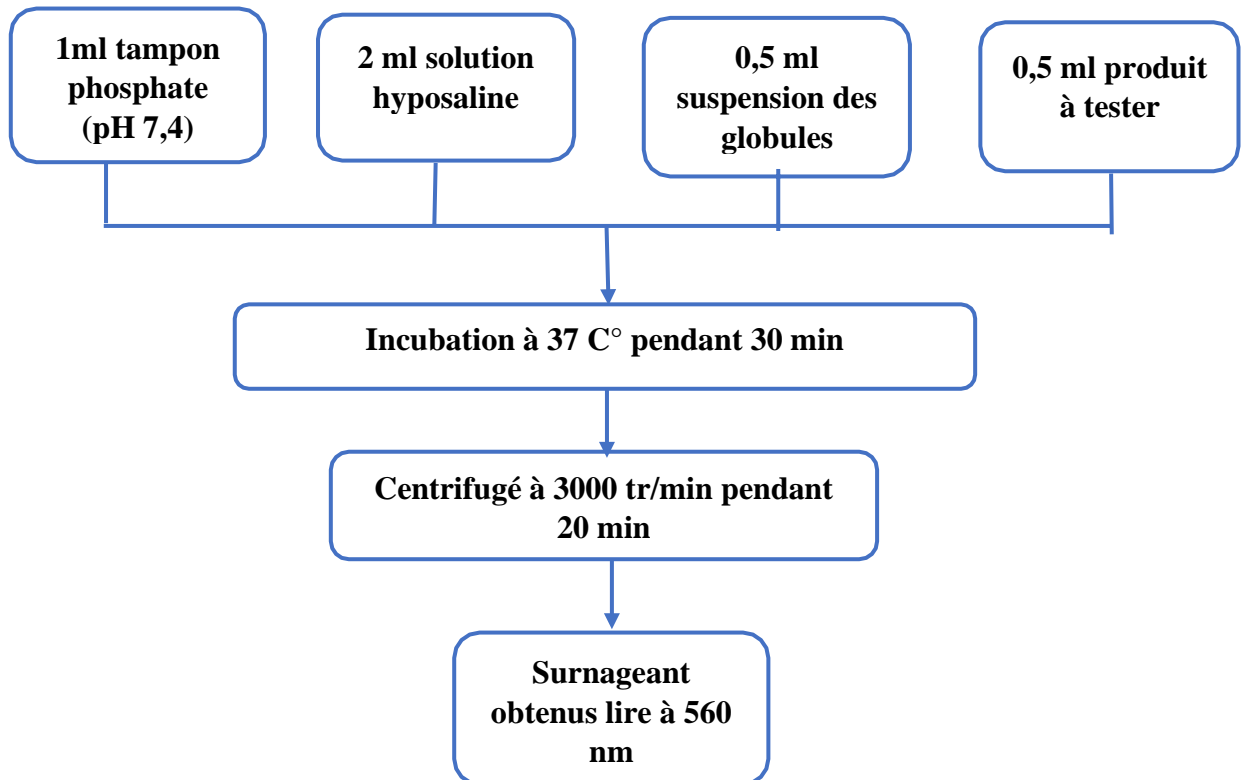


Figure 12 : Protocole de stabilisation membranaire HRBC [59].

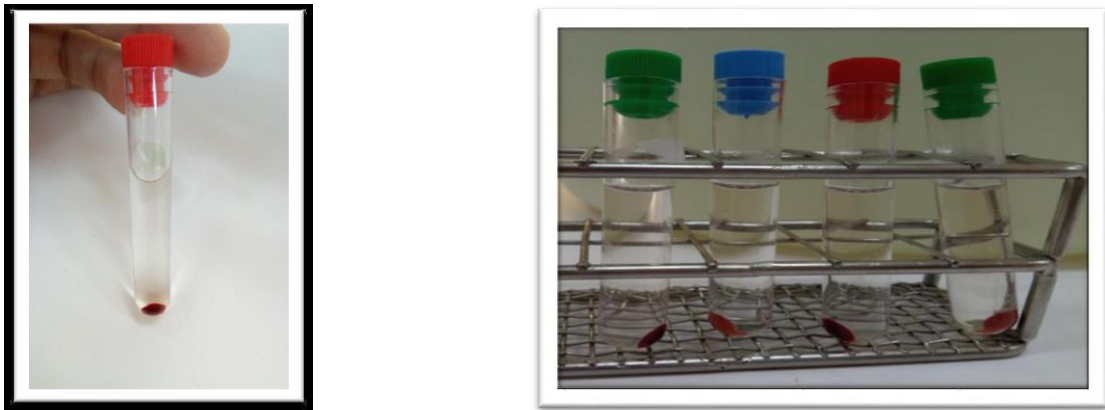


Figure 13 : Les mélanges d'essai pour dosage de l'activité de stabilisation de la membrane après la centrifugation.

➤ Inhibition de la dénaturation des protéines

Principe

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par application de stress ou des composés externes, comme un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou une chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées [62]. Sous l'action d'un traitement thermique, l'albumine peut subir des changements de conformation associés à un mauvais repliement de la structure 3D [63].

La dénaturation des protéines est l'une des causes bien documentées de l'inflammation et conduit à diverses maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent de l'activité anti-inflammatoire.

• Mode opératoire

Le test de la dénaturation des protéines a été réalisé selon la méthode décrite par **Erianti et al. (2015) [64]**. Trois solutions d'essais ont été préparées :

- ✚ **Le control négatif** : 0.45 ml de BSA à 5% avec 0.05 ml l'eau distillée.
- ✚ **Standard** : 0.45 ml de BSA à 5% avec 0.05 ml de Diclofénac sodique (50, 100, 150, 200, 250 µg/ml).
- ✚ **Essai** : 0.45 ml de BSA à 5% avec 0.05 ml de l'échantillon (50, 100, 150, 200,250µg/ml).

Toutes les solutions ci-dessus ont été ajustées à pH 6,3 en utilisant du HCl 1N. Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 20 minutes et la température a été augmentée pour incuber les échantillons à 57°C pendant 3 minutes.

Après refroidissement, 2,5ml de tampon phosphate ajusté à pH 6,3 ont été ajoutés aux solutions ci-dessus. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 416 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ Inhibition de la dénaturation} = (At - Ac / Ac) \times 100$$

Ac : absorbance de contrôle.

At : absorbance de test.

Chapitre IV

Résultats et discussions

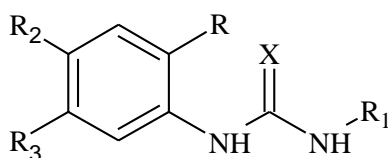
IV. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

IV.1. Stabilisation de la membrane des globules rouges

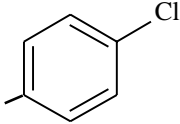
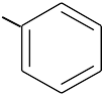
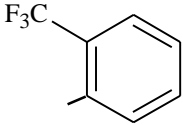
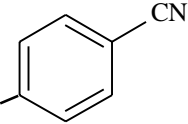
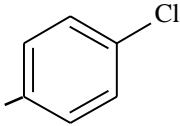
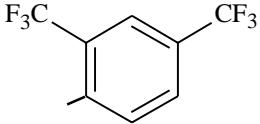
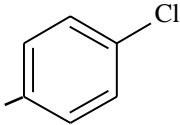
IV.1.1. Les produits testés :

Tout d'abord, les composés ont été classés en deux séries selon leurs structures chimiques. Nous avons réalisé des histogrammes comparatifs des pourcentages d'inhibition des lots traités par les composés testés (contrôle, l'aspirine, les dérivés salicylés). Le but de cette étude est d'identifier l'efficacité des produits à tester par rapport à l'aspirine (médicament de référence). Nous avons utilisé une concentration de 1000 µg/ml. Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition des composés de la série 1.



Composé	R	R ₁	R ₂	R ₃	X	% d'inhibition
HK15	-COOH		-	-	O	61.66
K10	-COOH		-	-	O	70.21
K104	-COOH		Cl	-	O	81.81
K105	-COOH		Cl	-	O	79.13
K110	COOCH ₃		-	Cl	O	75.85
K112	-COOH		Cl	-	O	21.52

K113	-COOH		-	-	O	80.06
K115	-OCH ₃	-CH(CH ₃) ₂	-	-	O	69.69
K114	-OCH ₃		-	-	O	77.46
K116	-OCH ₃		-	-	O	77.88
K119	-OCH ₃		-	-	O	44.39
K120	-OCH ₃	-C(CH ₃) ₃	-	-	O	29.69
K121	-OCH ₃		-	-	O	31.65
K122	-OCH ₃		-	-	O	78.41
K123	-OCH ₃		-	-	S	35.86
K108	-	-	-	-	-	74.61
K109	-	-	-	-	-	76.64
K125	-	-	-	-	-	23.21
Aspirine	-	-	-	-	-	74.04

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire montre que les dérivés de l'acide salicylique possèdent une activité remarquable selon leurs structures chimiques.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de stabilisation membranaire HRBC, des dérivés salicylés a été fait par comparaison avec l'aspirine, médicament de référence. Les résultats obtenus montrent un pourcentage d'inhibition pour l'aspirine de **74.04 %**.

Selon les résultats illustrés dans la (**Fig.14**) on observe que 9 composés testés ont montré une activité de stabilisation de la membrane plus importante que l'aspirine. Le composé K104 présente un effet de stabilisation membranaire avec un pourcentage de **81.81%** à 1000 µg/ml, qui est nettement supérieur à l'effet de l'aspirine à la même concentration.

Les composés H105, K108, K109, K110, K113, K114, K116 et K122 ont un pourcentage d'inhibition compris entre **74 % et 80 %** et ont donc un effet légèrement supérieur à celui de l'aspirine (**Schéma 08**).

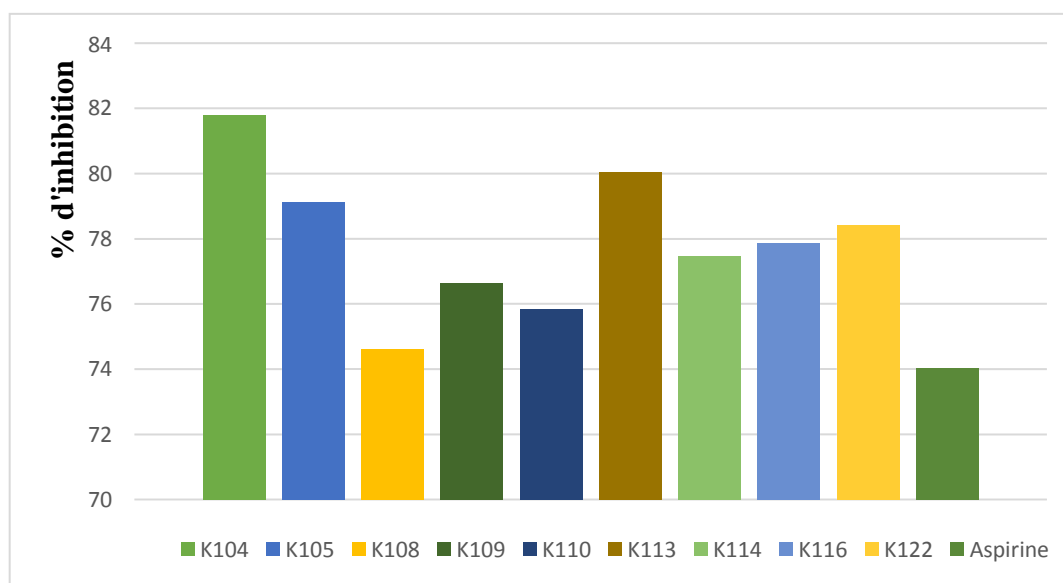


Figure 14 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (K104, K105, K108, K109, K110, K113, K114, K116, K122 et l'aspirine).

D'après les résultats obtenus pour ces 9 composés, on constate que :

L'efficacité du : K104 > K113 > K105 > K122 > K116 > K114 > K109 > K110 > K108 > Aspirine

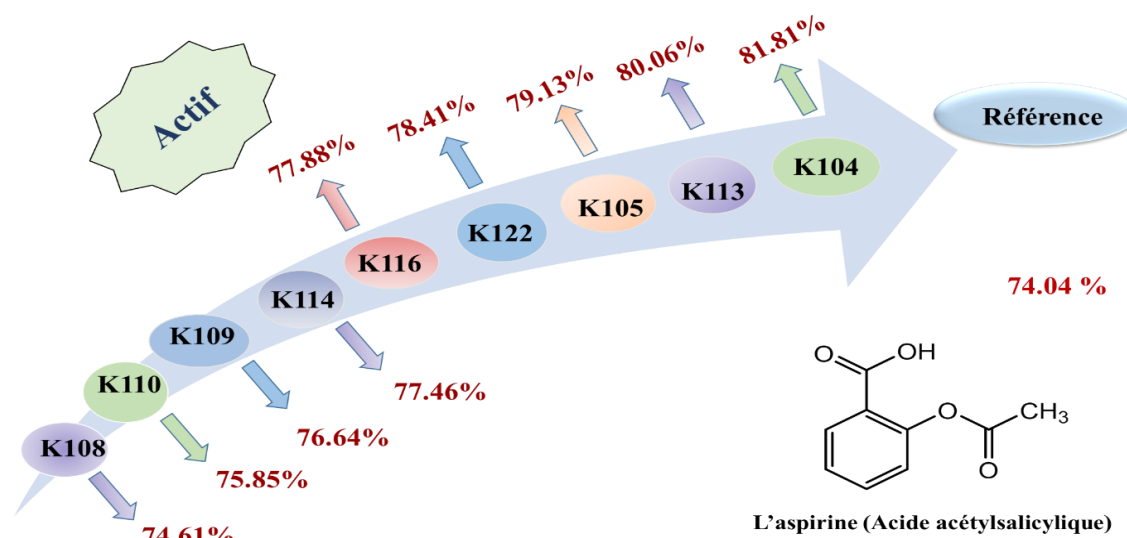


Schéma 08 : Les composés supérieur à l'aspirine de la série 01.

La stabilisation des membranes des globules rouges enregistré par les composés testés semble être due à la capacité de stabiliser les membranes lysosomales et l'inhibition de la libération de leurs constituants. Ces résultats suggèrent que ces composés possèdent une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges.

Les résultats représentés dans l'histogramme de la figure 15 montrent que le pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges des composés HK15, K10 et K115 est légèrement inférieur à celle de l'aspirine, avec un pourcentage d'inhibition de **61.66%**, **70.21%**, **69.69 %** respectivement à la concentration de 1000 µg/ml.

D'après les résultats obtenus, on constate que :

- L'efficacité du : Aspirine > K10 > K115 > HK15

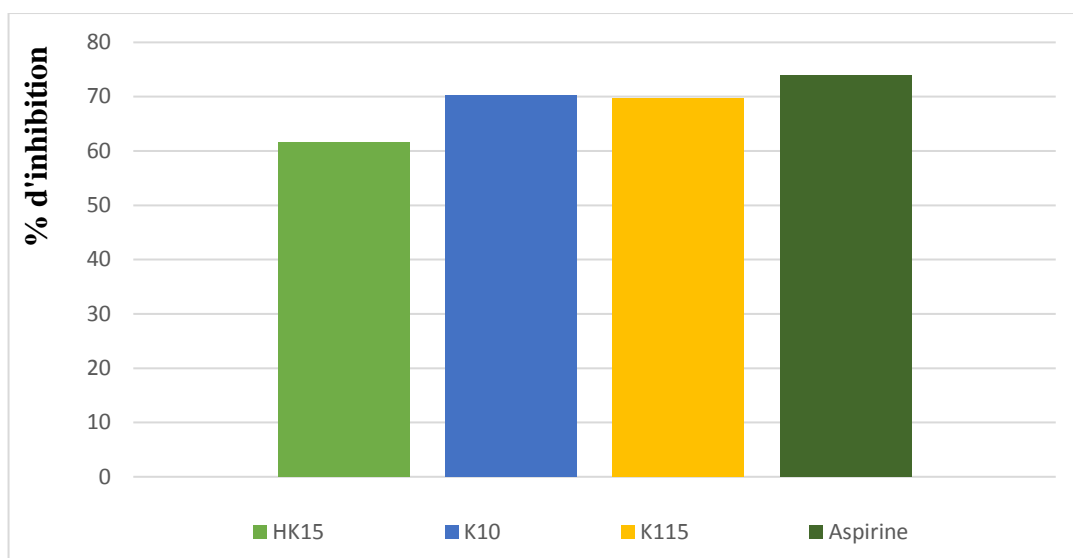


Figure 15 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (HK15, K10, K115 et l'aspirine).

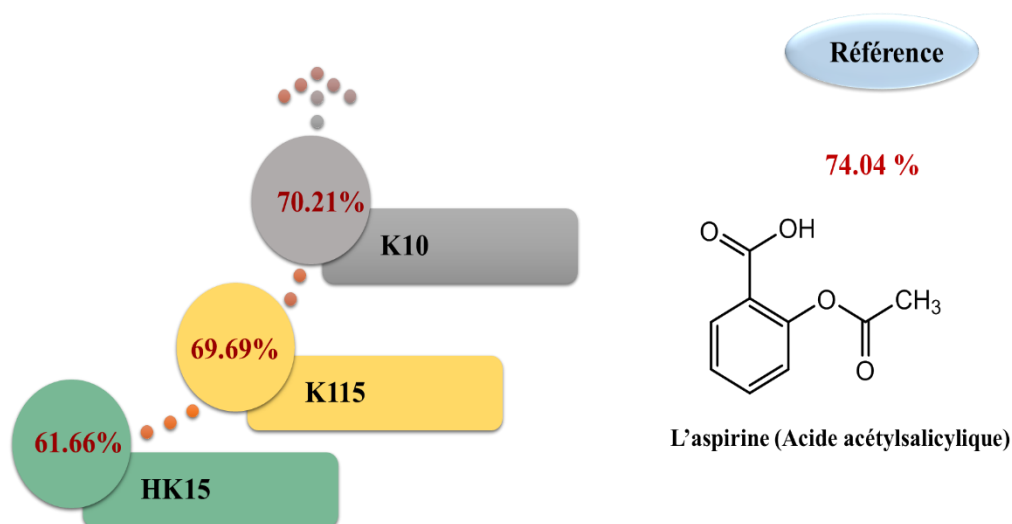


Schéma 09 : Les composés légèrement inférieure à l'aspirine de la série 01.

Selon les résultats illustrés dans l'histogramme de la figure 16 on peut suggérer que certains composés de la série 01 sont faiblement actifs par rapport à l'aspirine avec un pourcentage d'inhibition compris entre 21% et 44% à 1000 $\mu\text{g/ml}$. Il s'agit des composés K112, K119, K120, K121, K123, K125.

L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que ces composés possèdent une faible activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges (Schéma 10).

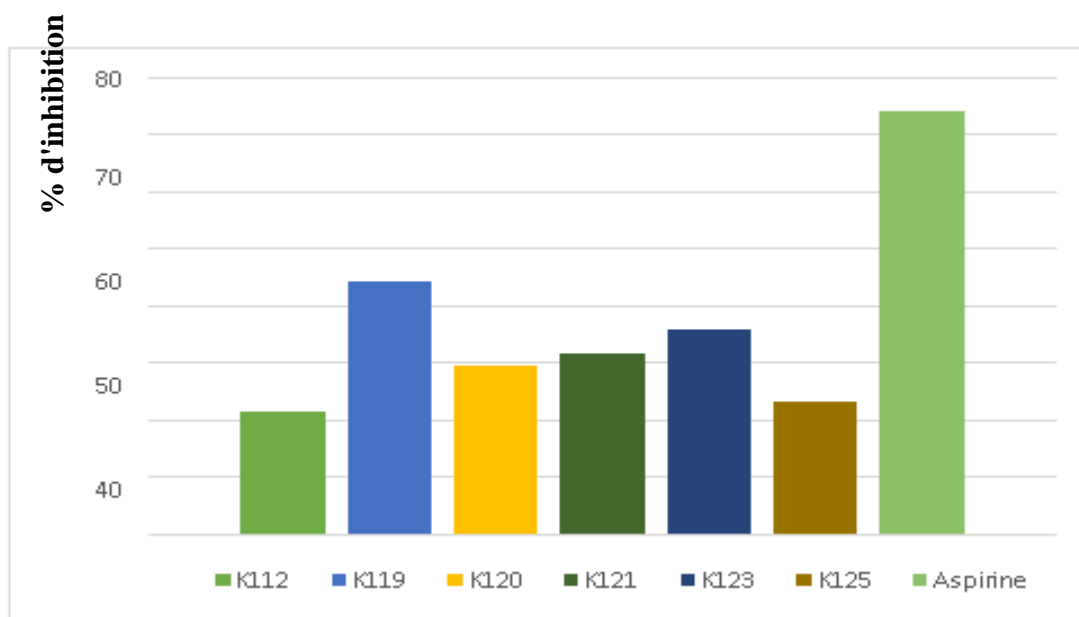


Figure 16 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (K112, K119, K120, K121, K123, K125 et l'aspirine).

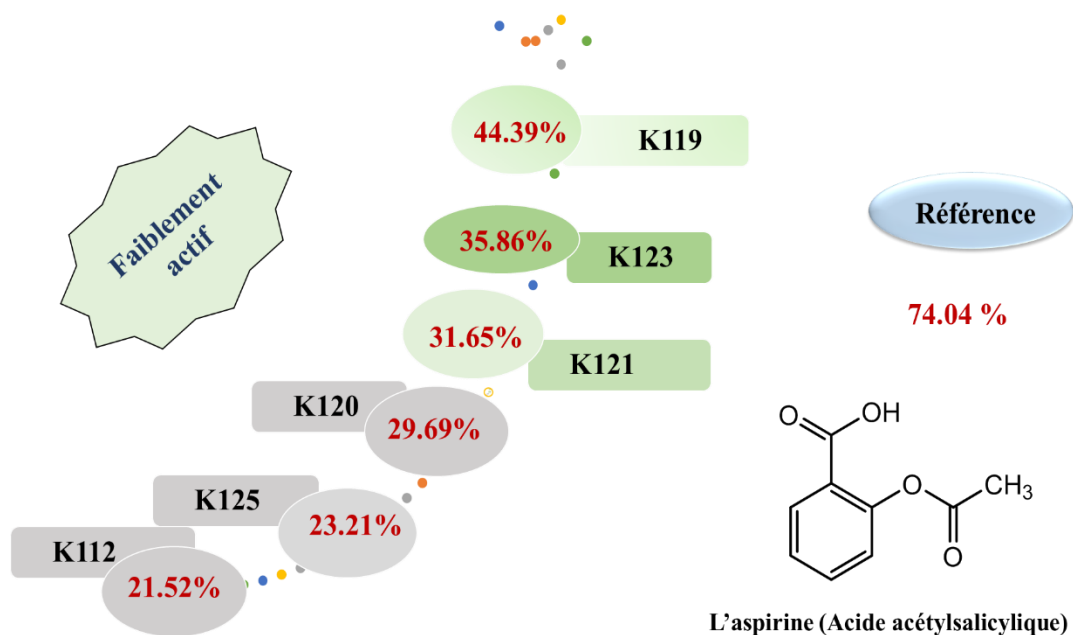
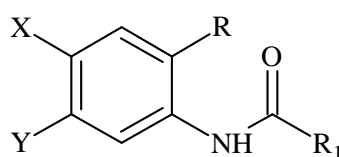


Schéma 10 : Les composés faiblement actifs à l'aspirine de la série 01.

L'étude de la relation structure activité pour cette série des molécules montre que les composés les plus actifs possèdent un groupe R = COOH (composés K104 : **81.81 %** ; K113 : **80.06 %** et K105 : **79.13 %**). Cependant l'étude de la relation structure activité reste difficile à réaliser pour cette série du fait que même les composés cyclisés (K108 et K109) ont un effet important.

Les résultats de la stabilisation de la membrane des globules rouges pour la série 02 sont représentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition de la série 2.



Composé	R	R ₁	X	Y	% d'inhibition
K126	-COOH		-	-	38.82
b15	-COOCH ₃		-	Cl	53.81
b12	-SO ₂ NH ₂	-CH ₂ Cl	-	-	82.95
b11	-COOCH ₃	-CH ₂ Cl	-	Cl	51.12
b10	-COOH	-CH ₂ Cl	Cl	-	49.78
b7	-COOCH ₃	-CH ₃	-	Cl	83.52
b6	-COOH	-CH ₃	Cl	-	62.78
b3	-COOCH ₃		-	Cl	77.84
b2	-COOH		Cl	-	73.83
K127					81.17
Aspirine					74.04

D'après les résultats représentés dans l'histogramme de la figure 17 on remarque que 4 composés de cette série possèdent un pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges supérieur à l'effet de l'aspirine. Les composés b7 et b12 ont particulièrement un effet plus important que ce soit par rapport à l'aspirine ou par rapport aux composés de la série 01 (**83.52 %** et **82.95 %** respectivement). Le composé K127 a un pourcentage de **81.17 %** et le b3 **77.83 %**. On peut conclure que ces composés présentent une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges significative par rapport à l'aspirine **74.04 %** à la même concentration 1000 µg/ml (**Schéma 11**).

D'après les résultats obtenus, on constate que :

- L'efficacité du : $b7 > b12 > K127 > b3 > \text{Aspirine}$

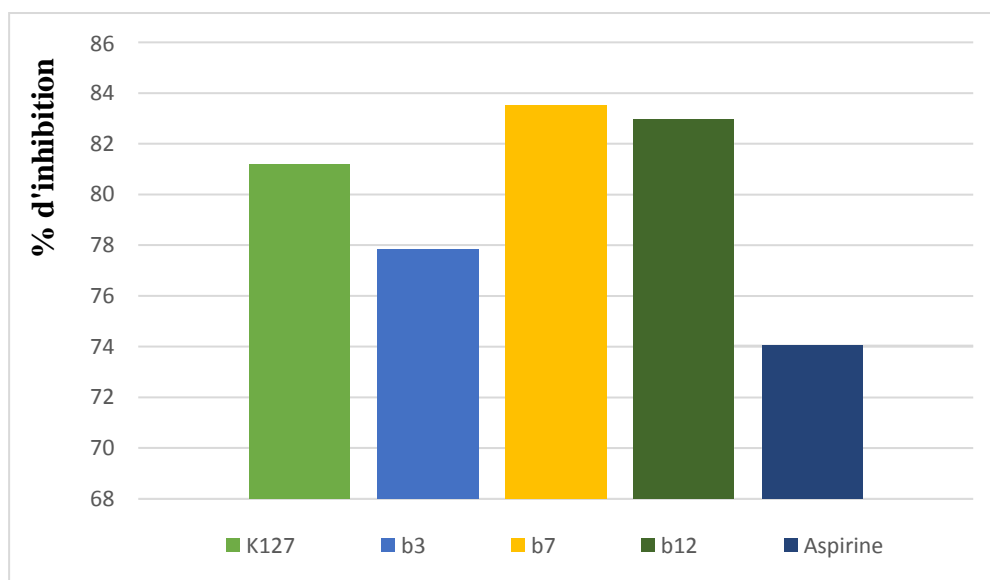


Figure 17 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (K127, b3, b7, b12 et l'aspirine).

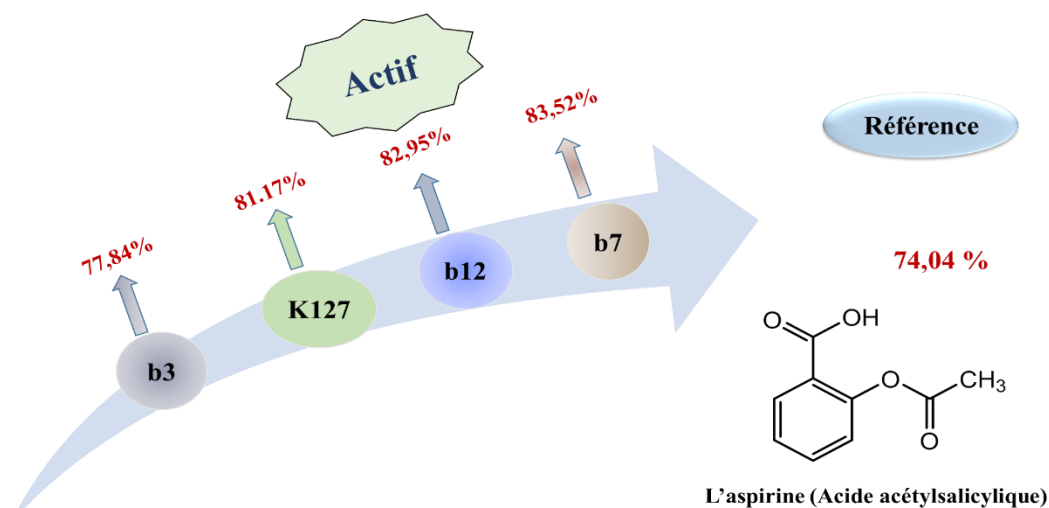


Schéma 11 : Les composés supérieurs à l'aspirine de la série 02.

L'histogramme de la figure 18 montre que les 4 composés (b2, b6, b11 et b15) possèdent une activité anti-inflammatoire avec un pourcentage d'inhibition similaire (b2 : 73.83 %) ou relativement inférieur à celui de l'aspirine (b6 : 62.78 % ; b11 : 51.12 % et b15 : 53.81 %).

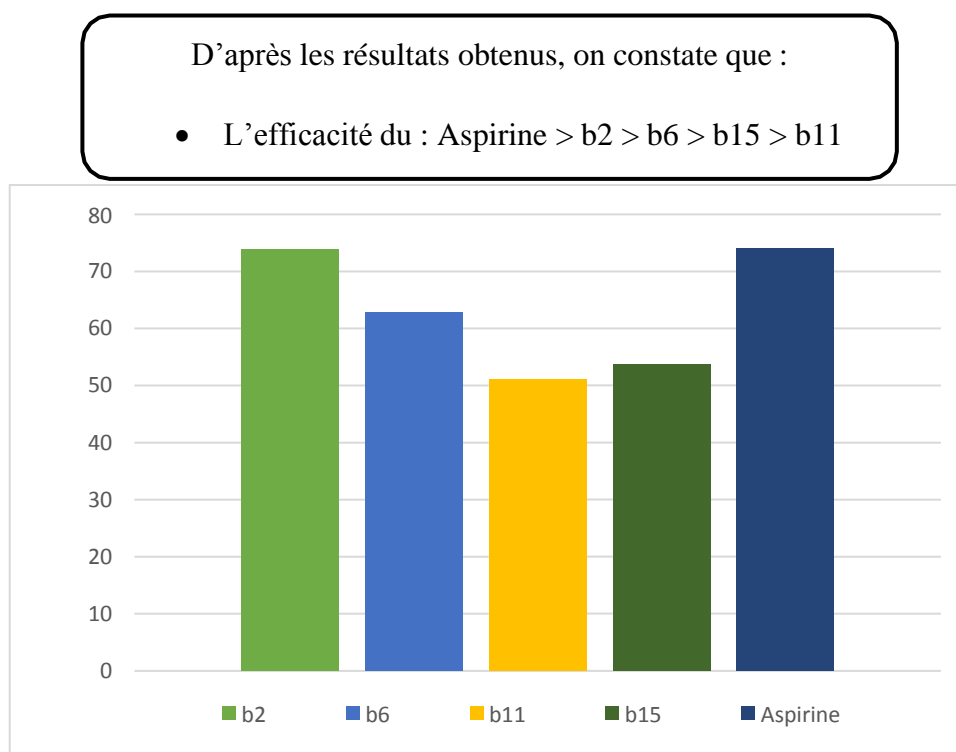


Figure 18 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (b2, b6, b11, b15 et l'aspirine).

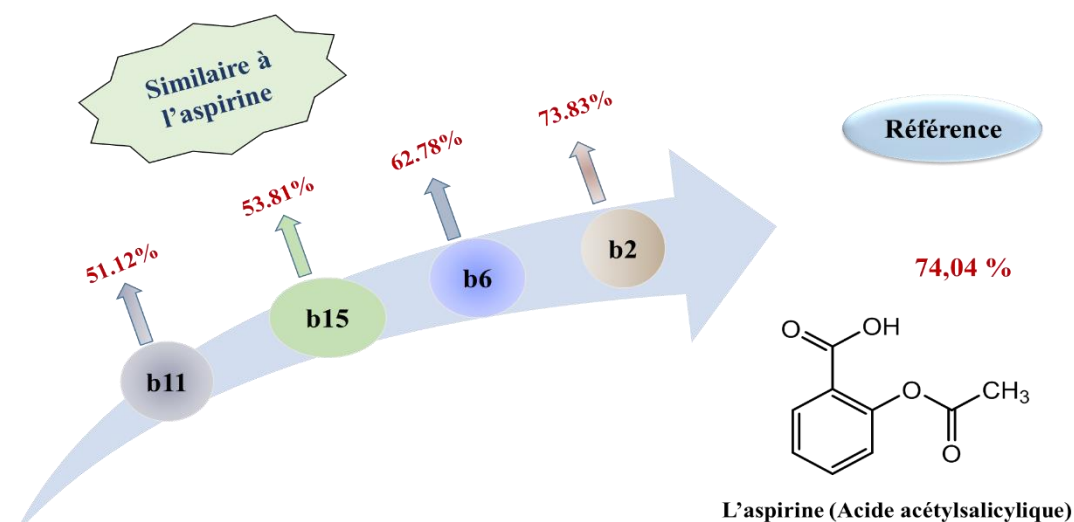


Schéma 12 : Les composés légèrement inférieure à l'aspirine de la série 02.

Les 2 composés de cette série b10 et K126 sont significativement faiblement actifs par la méthode de stabilisation membranaire HRBC par rapport à l'aspirine (Fig.19). Le pourcentage l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges de ces 2 composés à la concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$ est de **49.78%** et **38.82%** respectivement.

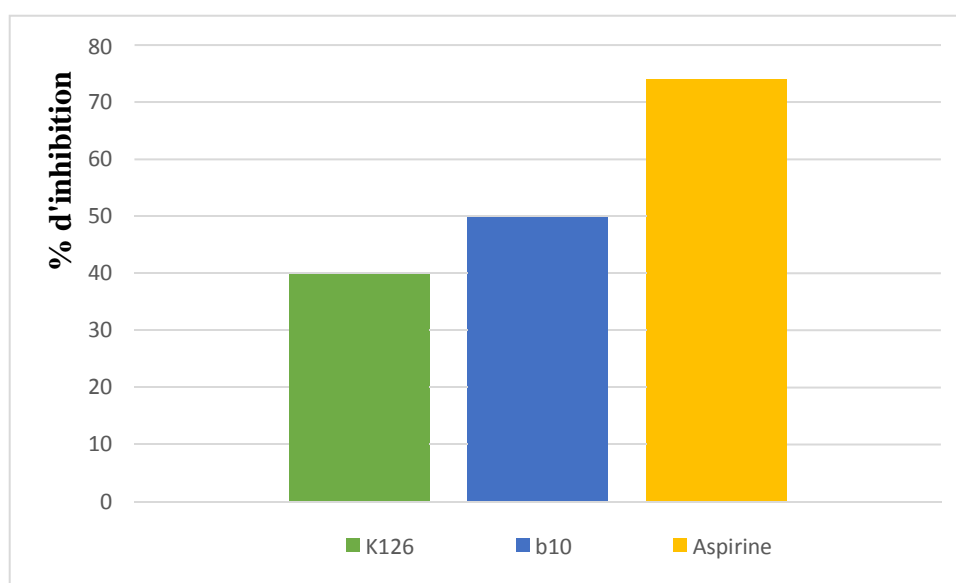


Figure 19 : L'histogramme des pourcentages d'inhibition des composés (K126, b10 et l'aspirine).

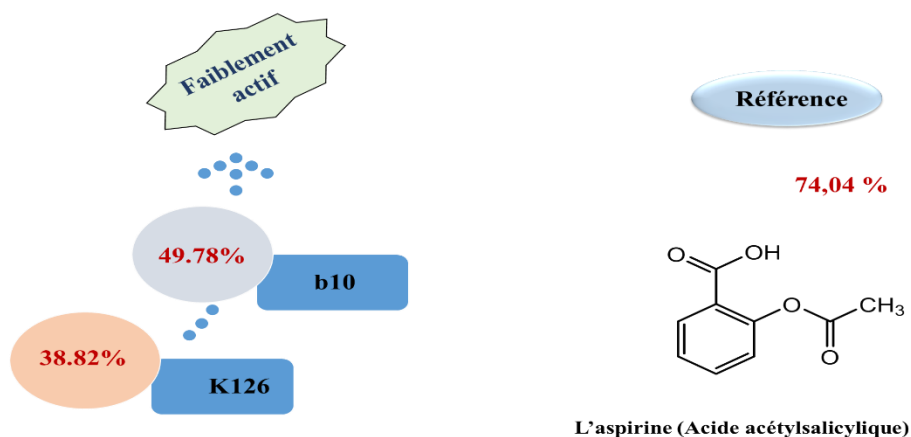


Schéma 13 : Les composés faiblement actifs à l'aspirine de la série 02.

L'étude de la relation structure activité pour cette série est très importante du fait de la similarité structurelle qui existe entre ces molécule et l'aspirine.

Le composé b7 le plus actif des deux séries présente une grande ressemblance structurelle avec l'aspirine. En fait on remplaçant la fonction acide par une fonction ester de la position 1 et l'oxygène de la fonction ester en position 2 par l'azote (fonction amide), l'activité a été amélioré d'environ 10 % par rapport à l'aspirine.

Du même le remplacement de la fonction acide par une fonction sulfonamide (b12) ou une fonction amide (K127) améliore notablement l'activité.

Conclusion

Sur la base des résultats de cette étude, on peut conclure que quelques produits testés des 2 séries ont présentés un effet anti-inflammatoire par inhibition de l'hémolyse des globules rouges en particulier les composés : b7, b12 et K104 qui ont un effet nettement significatif par rapport à celui de l'aspirine.

D'autres composés sont considérés possédant une activité équivalente à celle de l'aspirine.

Le classement total des produits en fonction de leur efficacité est le suivant :

b7>b12>K104>K127>K113>K105>K122>K116>b3>K114>K109>K110>K108



74% - 83% (composés actives)

Certains composés testés ont aussi une activité légèrement faible par rapport à l'aspirine

b2>K10>K115>b6>HK15>b15>b11



73% - 50% (faiblement actifs)

IV. 2. Comparaison les résultats *in vivo* et *in vitro*

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* sur quelques dérivés de l'acide salicylique (composés de la série 01 et 02) selon la méthode de WINTER évaluée chez les rats model de la patte inflammatoire a été effectuée par [56].

En effet, un effectif de 40 rats a été utilisé, ces rats ont été réparties en plusieurs lots (quatre rats par lot), chaque lot reçoit respectivement par voie orale une solution de NaCl (0,9 %) (groupe témoin), diclofénac 50 mg/Kg (groupe standard), les composés à tester (50 mg / Kg).

Une heure après les rats de tous les groupes reçoivent une injection de carragénine à 1 %.

L'œdème a été évalué par la mesure du diamètre (mm) de la patte avant et à des intervalles d'un quart d'heure, pendant 5 heures après injection de la carragénine.

Les résultats de cette étude montrent que l'injection de la carragénine (1 %) entraîne une augmentation du volume de la patte des rats de tous les lots. De plus, l'administration orale du diclofénac (50 mg/Kg) réduit l'augmentation de l'œdème de la patte des rats.

Le traitement par les analogues de l'AS à la dose de 50 mg/Kg, exerce une action anti-inflammatoire qui varie en fonction du squelette du composé après une heure d'administration.

Le tableau 13 représente le pourcentage d'inhibition de l'augmentation de l'œdème des rats (*in vivo*) et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des GR par les dérivés de l'AS.

Tableau 13 : Comparaison des résultats in vivo et in vitro.

Les produits à tester	% d'inhibition <i>in vivo</i>	% d'inhibition <i>in vitro</i>
K104	91.83	81.81
b3	89.18	77.84
K125	88.71	23.21
b12	83.94	82.95
K120	79.88	29.69
K122	85.77	78.41
K126	68.57	38.82
b7	62.83	83.52
K121	71.08	31.65
Diclofénac	92.05	-
Aspirine	-	74.04

La comparaison des résultats obtenus sur le modèle de la patte inflammatoire *in vivo* avec les résultats obtenus sur les mêmes composés *in vitro* montrent une grande approche dans l'activité des deux modèles étudiés. On observe que les composés les plus actifs *in vitro* présentent aussi une activité sur le modèle *in vivo* à savoir les composés : b7, b12, K104, K122, b3.

En remarque en particulier que les 2 composés K104 et b12 présentent une meilleure activité que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. Par contre le composé b7 le plus actif *in vitro* présente une activité modéré *in vivo*. Cependant quelques composés qui ont été actif *in vivo* n'ont pas montré une bonne activité *in vitro* surtout les 2 composés K120 et K125.

En fin on peut constater que les composés des 2 séries étudiés par les modèles présentent une nette activité anti-inflammatoire *in vivo* par rapport au diclofénac ou *in vitro* par rapport à l'aspirine.

IV.3. Inhibition de la dénaturation de l'albumine (BSA)

Comme c'est mentionné plus précédemment la dénaturation des protéines est l'une des causes décrites qui induit l'inflammation et conduit à diverses maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent de l'activité anti-inflammatoire. Les protéines dénaturées perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par l'action de divers agents et de ce fait elles perdent leurs fonctions biologiques.

Les résultats obtenus de l'effet de nos composés pour les 2 séries étudiées ou par le control négatif et le composé de référence, diclofénac, n'ont pas montré une différence significative dans la mesure de l'absorbance. De plus l'absorbance mesuré pour le control négatif (BSA à 5 %) avant ou après traitement par la chaleur est non significative. Pour ces raisons nous n'avons pas présenté les résultats de ce test.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'acide salicylique est un métabolite phénolique synthétisé naturellement par un certain nombre de plantes [1], on le trouve dans les fruits, sous forme estérifiée de salicylate de méthyle. C'est une molécule impliquée dans les phénomènes physiologiques végétaux, qui déclenchent les réponses de défense végétale, résistent aux attaques fongiques, bactériennes ou virales. Il est utilisé comme médicament et comme précurseur de l'acide acétylsalicylique, l'aspirine.

Au cours de ce travail, nous avons présenté une recherche bibliographique contenant une étude sur l'acide salicylique et ses dérivés ainsi qu'une illustration sur l'inflammation et l'activité anti-inflammatoire.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de 2 séries des dérivés de l'acide salicylique *in vitro* a été réalisée par l'utilisation de la méthode de l'inhibition de l'hémolyse des membranes des globules rouges dans le sang humain et par la méthode de l'inhibition de la dénaturation des protéines. Les résultats de cette étude ont été comparés avec des résultats obtenus antérieurement sur un modèle *in vivo*.

Les résultats obtenus ont montré que quelques produits testés présentent une capacité de l'inhibition de l'hémolyse des GR plus importante par rapport à l'aspirine, utilisée comme référence, en particulier les composés : K104, K127, b7 et b12. Ces résultats suggèrent que ces composés présentent une activité anti-inflammatoire significative par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges par rapport à l'aspirine à la même concentration 1000 µg/ml.

L'étude comparative des résultats obtenus sur le modèle de la patte inflammatoire *in vivo* avec les résultats obtenus sur les mêmes composés *in vitro* montrent une grande approche dans l'activité des deux modèles étudiés, en particulier les 2 composés K104 et b12 qui présentent une meilleure activité que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

Les résultats obtenus de l'effet de nos composés pour les 2 séries étudiées ou par le control négatif et le composé de référence, diclofénac, n'ont pas montré une différence significative dans la mesure de l'absorbance dans le test de la dénaturation des protéines.

En fin des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre le mécanisme responsable de l'effet anti-inflammatoire des produits testés. Il serait aussi intéressant de compléter ce travail par d'autres tests biologiques qui devraient être effectués.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- [1] B. Prithiviraj, H. P. Bais, T. weir et al. « Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans* », *Infection and immunity*, 2005, vol. 73, n°9, p. 5319.
- [2] I. Raskine, « Rôle de l'acide salicylique chez les plantes », *Revue annuelle de biologie végétale*, 1992, vol. 43, n°1, p. 439-463.
- [3] <http://wiki.science.amustante.net/index.php?title=synth%C3%A8se-de-1%27aspirine>; site visité en décembre 2014.
- [4] ACIDE SALICYLIQUE, fiche de sécurité du Programme Mondial sur la Sécurité des Substances Chimiques, consultée le 9 mai 2009.
- [5] J. Malamy, J.P. Carr, D.F Klessig et al. « Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection », *Science*, 1990, vol. 250, n° 4983, p. 1002-1004.
- [6] T.P. Delaney, S. Uknes, B. Vernooij et al. « A central role of salicylic acid in plant disease resistance », *Science*, 1994, vol. 266, n° 5188, p. 1247-1250.
- [7] T. Gaffney, L. Friedrich, B. Vernooij et al. « Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance », *Science*, 1993, vol. 261, n° 5122, p. 754-756.
- [8] M.B. Shine, J.W. Yang, M. EL-HABBAK et al. « Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean », *New Phytologist*, 2016, vol. 212, n° 3, p. 627-636.
- [9] J. Chong, M.A. Pierrel, R. Atanassova et al. « Acide benzoïque libre et conjugué dans les plants de tabac et les cultures cellulaires ». Accumulation induite lors du déclenchement de réponses de défense et rôle de précurseurs de l'acide salicylique, *Physiologie végétale*, 2001, vol. 125, n° 1, p. 318-328.
- [10] S. Hayat, B. Ali et A. Ahmad. « Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants », In: *Salicylic acid: A plant hormone*. Springer, Dordrecht, 2007. p. 1-14.
- [11] N. Yalpani, J. León, M.A. Lawton et al. « Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco », *Plant physiology*, 1993, vol. 103, n° 2, p. 315-321.
- [12] P. Silverman, M. Seskar, D. Kanter et al. « Salicylic acid in rice (biosynthesis, conjugation, and possible role) », *Plant physiology*, 1995, vol. 108, n° 2, p. 633-639.

- [13] J.P. Métraux, « Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis », *Trends in plant science*, 2002, vol. 7, n° 8, p. 332-334.
- [14] D. Rekhter, D. Lüdke, Y. Ding et al. « Biosynthèse dérivée des isochorismates de l'acide salicylique, l'hormone du stress des plantes », *Sciences*, 2019, vol. 365, n° 6452, p. 498-502.
- [15] AN. Chuanfu et MOU. Zhonglin, « Salicylic acid and its function in plant immunity F », *Journal of integrative plant biology*, 2011, vol. 53, n° 6, p. 412-428.
- [16] E. Horváth, M. Pál, G. Szalai et al. « Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants », *Biologia Plantarum*, 2007, vol. 51, n° 3, p. 480-487.
- [17] "Acide salicylique". www.drugbank.ca. Archivé de l'original le 2018-10-29. Récupéré 21/12/2018.
- [18] D.F. Klessig, J. Durner, R. Noad et al. « Signalisation de l'oxyde nitrique et de l'acide salicylique dans la défense des plantes », *Actes de l'Académie nationale des sciences*, 2000, vol. 97, n° 16, p. 8849-8855.
- [19] B.N. Kunkel et D.M. Brooks, « Cross talk between signaling pathways in pathogen defense », *Current opinion in plant biology*, 2002, vol. 5, n° 4, p. 325-331.
- [20] "Acide salicylique". inchem.org. Archivé de l'original le 18/12/2008. Récupéré 13/10/2008.
- [21] G. Booth, « Naphthalene derivatives », *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2000.
- [22] L. Candy, « Etude des conditions de synthèse et des propriétés d'ASA (anhydrides alkényles succiniques) d'esters d'huiles végétales-Application à l'industrie papetière ». 2003. Thèse de doctorat.
- [23] W.W. Kaeding, « Oxidation of aromatic acids. IV. Decarboxylation of salicylic acids », *The Journal of Organic Chemistry*, 1964, vol. 29, n° 9, p. 2556-2559.
- [24] L.C. Van Loon et E.A. Van Strien, « Les familles de protéines liées à la pathogénèse, leurs activités et l'analyse comparative des protéines de type PR-1 », *Pathologie physiologique et moléculaire des plantes*, 1999, vol. 55, n° 2, p. 85-97.
- [25] N.I. Vasyukova et N.G. Gerasimova, « Ozerets kovskaya, OL », *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*, 1999, vol. 35, n° 5, p. 557-563.
- [26] Z. Chen et D.F. Klessig, « Identification d'une protéine de liaison à l'acide salicylique soluble qui peut fonctionner dans la transduction du signal dans la réponse de résistance aux

maladies des plantes », *Actes de l'Académie nationale des sciences*, 1991, vol. 88, n° 18, p. 8179-8183.

[27] E.E. Farmer, H. Weber et S. Vollenweider, « Signalisation des acides gras chez *Arabidopsis* », *Planta*, 1998, vol. 206, n° 2, p. 167-174.

[28] I. Hirao et Y. Hara, « The Carboxylation of Phenol Derivatives. VI Synthesis of p-Hydroxybenzoic Acid and Salicylic Acid from Alkali Phenoxides in Nitrobenzene », *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 1967, vol. 25, n° 7, p. 577-581

[29] A. Müller, *Org. Synth. (collect. vol. 2)*, 1943, p. 535.

[30] E.H. Rodd, (Ed.). « *Chemistry of Carbon Compounds: pt. AB. Aromatic compounds* », Elsevier Publishing Company, 1956.

[31] W. Forth, D. Henschler et W. Rummel, « Pharmacologie et Toxicologie », *Bibliographisches Institut, Mannheim*, 1975, p. 425.

[32] P. Kallos, et HD. Schlumberger « Impuretés immunogènes dans l'acide acétylsalicylique », *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1978, vol. 30, n° 1, p. 67-68.

[33] B. Weill et F. Batteux, « *Immunopathologie et réactions inflammatoires* », De Boeck Supérieur, 2003, p. 12-23.

[34] D. Muster, « Médicaments de l'inflammation », *EMC-Stomatologie*, 2005, vol. 1, n° 1, p. 21-29.

[35] I.M. Transdisciplinaires, « Item 174-Préscription et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens », In : *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 2008, Vol. 135, p. 163-167.

[36] H. Yahoui et A. Merimi, « *Activité antioxydante et anti-inflammatoire de l'extrait hydro-alcoolique d'*Ajuga iva* (ivette musquée)* », Thèse de doctorat, Université de Bouira. 2018, p. 17.

[37] M. Rousselet, J.M. Vignaud, P. Hofman et al. « Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3) », *Copyright AFECAP*, 2005, p. 1-75.

[38] C.N. Serhan, P.A. Ward et Gilroy, D.W, « *Fundamentals of inflammation* », Cambridge University Press, 2010, p. 2-3.

[39] J. Kuby, T.J. Kindt, R.A. Goldsby et al. « *Immunologie: le cours de Janis Kuby* », Dunod, 2003.

[40] G.B. Ryan et G. Majno, « Acute inflammation ». A review. *The American journal of pathology*, 1977, vol. 86, n° 1, p. 183.

[41] Y. Henrotin, G. Deby-Dupont et J.Y. Reginster, « Les médiateurs biochimiques de l'inflammation », *Revue Médicale de Liège*, 2001, vol. 56, n° 6, p. 433-42.

[42] L. Prin, E. Hachulla, et al. Available from : <http://w3med.univlille2.fr/inflammation/documents/Immuno1.pdf>. 2009.

[43] S. Rahmani, N. Belboukhari, K. Sekkoum et al. « Evaluation de l'activité anti inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (Plumbaginacea) », *Algerian journal of Arid Environment "AJAE"*, 2016, vol. 6, n°1, p. 80-86.

[44] P. Guilpain, et C. Le Jeune, « Effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs des glucocorticoïdes », *La Presse Médicale*, 2012, vol. 41, n°4, p. 378-383.

[45] M. Neal, *Pharmacologie médicale* ; 2^{ème} édition française. 1999, p. 70-71.

[46] A. Chiolero, G. Würzner et M. Burnier, « Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2 : moins d'effets rénaux que les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques ? », *Néphrologie*, 2000, vol. 21, n° 8, p. 425-430.

[47] J.Y. Jouzeau, M. Daouphars, A. Benani, A et al. « Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase », *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 2004, vol. 28, p.7-17.

[48] J.L. Wang, J. Carter, J.R. Jeffery et al. « La nouvelle classe des benzopyranes d'inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase-2-partie I : Le premier candidat clinique », *Lettres de chimie bioorganique et médicinale*, 2010, vol. 20, n° 23, p. 7155-7158.

[49] J.F. Nicolas, « Immunologie clinique et allergologie : Aspirine et AINS : intolérance et allergie ». 2001, p. 55-58.

[50] R.O. Day et G.G. Graham, « Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs : Overview », *Compendium of Inflammatory Diseases*, 2016, p. 986-993.

[51] J.R. Vane et R.M. Botting, « New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs », *Inflammation research*, 1995, vol. 44, n° 1, p. 1-10.

[52] J.P. Grunfeld, « Dictionnaire médecine Flammarion ; 7^{ème} édition ». 2002, 66.

[53] V. Fuster, et J.M. Sweeny, « Aspirine : un aperçu thérapeutique historique et contemporain », *Diffusion*, 2011, vol. 123, n° 7, p. 768-778.

- [54] V. Baaroun et V. Descroix, « Médicaments antalgiques de la douleur aiguë en médecine buccale », *Médecine buccale*, 2012, p. 1-10.
- [55] E. Hachulla, B. Jude, et U. Pasturel-Michon, « Inhibiteurs spécifiques de la Cox-2 et hémostase », *Sang Thrombose Vaisseaux*, 2002, vol. 14, n° 3, p. 147-52.
- [56] L. Deneche et O. Djamaa, « Evaluation pharmacologique de quelques analogues de l'acide salicylique ». Diss. Université jijel 2020.
- [57] H. Chabbi et M. Mekhalfa, « Synthèse et caractérisation des analogues de l'acide salicylique ». Diss. Université jijel, 2018.
- [58] J. Sadique, W.A. Al-Rqobahs, E.I. Bughaith et al. « The bioactivity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system », *Fitoterapia*, 1989, vol. 60, n° 6, p. 525-532.
- [59] G. Gadmsetty, S. Maru, A. Tyagia et al. « Effets anti-inflammatoires, cytotoxiques et antioxydants des extraits méthanoliques de *Drypetes sepiaria* (Euphorbiaceae) », *Revue Africaine des Médecines Traditionnelles, Complémentaires et Alternatives*, 2013, vol. 10, n°5, p. 274-282.
- [60] B. Kar, R.S. Kumar, I. Karmakar et al. « Antioxydant and in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves », *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, vol. 2, n° 2, p. 976-980.
- [61] M. Govindappa, M.N. Poojashri, G. Santoyo et al. « Activité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire in vitro et criblage phytochimique de l'extrait aqueux de *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc », *Journal de recherche sur les plantes médicinales*, 2011, vol. 5, n° 24, p. 5718-5729.
- [62] G. Leelaprakash et S. M. Dass et al. « In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *enicostemmaaxillare* », *International Journal of Drug Development and Research*, 2011, vol. 3, n° 3, p. 189-196.
- [63] V. Militello, V. Vetri, et M. Leone, « Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin », *Biophysical chemistry*, 2003, vol. 105, n° 1, p. 133-141.
- [64] F. Erianti, AR. Nadhila et S.E. Adiba, « Criblage de fruits tropicaux pour l'activité anti-inflammatoire in vitro dans le sud du Kalimantan en Indonésie », *J Med Biol Eng*, 2015, vol. 4, p. 407-411.
- .

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des dérivés de l'acide salicylique *in vitro* par 2 méthodes : Le test de l'inhibition de la dénaturation des protéines et le test de la stabilisation de la membrane des globules rouges humains exprimée par les pourcentages de l'hémolyse des globules rouges.

Les résultats obtenus ont montré que quelques produits testés présentent une capacité de l'inhibition de l'hémolyse des GR plus importante par rapport à l'aspirine, utilisée comme référence, en particulier les composés : K104, K127, b7 et b12. Ces résultats suggèrent que ces composés présentent une activité anti-inflammatoire significative par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges par rapport à l'aspirine à la même concentration 1000 µg/ml.

L'étude comparative des résultats obtenus sur le modèle de la patte inflammatoire *in vivo* avec les résultats obtenus sur les mêmes composés *in vitro* montrent une grande approche dans l'activité des deux modèles étudiés, en particulier les 2 composés K104 et b12 qui présentent une meilleure activité que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

Les résultats obtenus de l'effet de nos composés pour les 2 séries étudiées ou par le control négatif et le composé de référence, diclofénac, n'ont pas montré une différence significative dans la mesure de l'absorbance dans le test de la dénaturation des protéines.

Mots clés : L'acide salicylique, anti-inflammatoire, *in vitro*, BSA, HRBC, aspirine.

Abstract

The objective of this study is the evaluation of the anti-inflammatory activity of salicylic acid derivatives in vitro by 2 methods : The test of the inhibition of the denaturation of proteins and the test of the stabilization of the membrane of human red blood cells expressed as the percentages of hemolysis of red blood cells.

The results obtained showed that some products tested have a greater ability to inhibit RBC hemolysis compared to aspirin used as a reference, in particular the compounds : K104, K127, b7 and b12. These results suggest that these compounds exhibit significant anti-inflammatory activity by inhibiting the hemolysis of red blood cells compared to aspirin at the same concentration 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

The comparative study of the results obtained on the model of the inflammatory leg *in vivo* with the results obtained on the same compounds *in vitro* show a large approach in the activity of the two models studied, in particular the 2 compounds K104 and b12 which exhibit a better activity whether *in vivo* or *in vitro*.

The results obtained from the effect of our compounds for the 2 series studied or by the negative control and the reference compound, diclofenac, did not show a significant difference in the measurement of the absorbance in the test for the denaturation of protein.

Keywords : Salicylic acid, anti-inflammatory, *in vitro*, BSA, HRBC, aspirin.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للالتهابات لمشتقات حمض الساليسيليك في المختبر بطريقتين: اختبار تثبيط تمسخ البروتينات واختبار استقرار غشاء خلايا الدم الحمراء البشرية. معبراً عنها بالنسب المئوية لانحلال الدم في خلايا الدم الحمراء.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن بعض المنتجات المختبرة تظهر قدرة أكبر على تثبيط انحلال الدم في كرات الدم الحمراء مقارنة بالأسبرين، المستخدم كمرجع، ولا سيما المركبات K104 و K127 و b7 و b12. تشير هذه النتائج إلى أن هذه المركبات تظهر نشاطاً كبيراً مضاداً للالتهابات عن طريق تثبيط انحلال الدم في خلايا الدم الحمراء مقارنة بالأسبرين بنفس التركيز 1000 ميكروغرام / مل.

تُظهر الدراسة المقارنة للنتائج التي تم الحصول عليها على نموذج الساق الالتهابية في الجسم الحي مع النتائج التي تم الحصول عليها على نفس المركبات في المختبر نهجاً كبيراً في نشاط النموذجين المدروسين، لا سيما المركبين K104 و b12 اللذين يظهران نشاطاً أفضل سواء في الجسم الحي أو في المختبر.

النتائج التي تم الحصول عليها من تأثير مركباتنا للسلسلة 2 المدروسة أو عن طريق التحكم السلبي والمركب المرجعي، ديكلوفيناك، لم تظهر فرقاً كبيراً في قياس الامتصاصية في اختبار تمسخ البروتين.

الكلمات المفتاحية: حمض الساليسيليك، مضاد للالتهابات، في المختبر، BSA، HRBC، أسبرين.