

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**ARABI Oumaima**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES**

**Spécialité : Nutrition et Pathologie**

THÈME

**Caractérisation et activités biologiques du  
mucilage des graines de *Lepidium sativum* L.**

DEVANT LE JURY

|              |                               |     |               |
|--------------|-------------------------------|-----|---------------|
| Présidente   | Dr ZIAR Hasnia                | MCA | U. Mostaganem |
| Encadrante   | Dr YAHLA Imène                | MCA | U. Mostaganem |
| Examinatrice | Dr KOUADRI BOUDJELTHIA Nacima | MAA | U. Mostaganem |

# *Dédicaces*

*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 mes très chers parents qui m'ont apporté de l'aide et m'ont toujours  
poussée vers l'avant. Sans eux je n'aurais pas pu être ce que je suis, en  
reconnaissance de leurs efforts, leurs amour et leurs encouragements  
durant toutes mes études*

*A mes chers frères et ainsi mes merveilleuses sœurs pour leur présence, leur  
soutien et encouragements*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai  
toujours pour vous. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez  
consentis pour mon étude.*

*A mes neveux tous et mes nièces : Romaiassa, Fatima, Achwak et Rimas*

*A mes cousines Siham, Chaima, Ikram, Salima et Basma*

*A mes très chères copines : Fatima, Yousra, Nani, Chahinez et Manel*

*merci pour les bons souvenirs*

*A toute ma famille*

*OUMAIMA*

# *Remerciements*

*Ce travail a été réalisé au niveau de Laboratoire de biochimie de la faculté de Science de la Nature et de la Vie, Université abd-el-hamid ibn badis, Mostaganem.*

*Avant tout propos, je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Je voudrais dans un premier temps remercier Dr. YAHLA Imène de m'avoir encadré et pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils durant la réalisation de ce travail, et surtout pour son soutien dans les moments difficile.*

*J'adresse mes J'exprime mes vifs remerciements aux membres du jury , Mme la présidente Dr ZIAR Hasnia et Mme l'examinatrice Dr Kouadri-Boudjelthia Nacima d'avoir accepté d'examiner ce modeste mémoire.*

*Enfin, je remercie toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*OUMAIMA*

### RESUME

Le cresson alénois (*Lepidium sativum*) présente de nombreux avantages, à la fois nutritionnels et sanitaires, car il s'agit de l'une des plantes médicinales importantes pour le corps, qui a la capacité de traiter de nombreuses maladies, ce qui a conduit certaines études à recommander son intégration à l'alimentation.

Notre travail consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire du mucilage des graines de *Lepidium Sativum* L. Les effets thérapeutiques de cette plante ont été étudiés par deux méthodes : le test d'inhibition de la dénaturation des protéines et la méthode de stabilisation des membranes des globules rouges HRBC. Les résultats obtenus montrent que le mucilage de *L. sativum* exerce un pouvoir inhibiteur de la dénaturation des protéines de 105%. En outre, l'effet de la stabilité des membranes des globules rouges observé est de 68%. On déduit des résultats obtenus que le mucilage de *L. sativum* possède une activité anti-inflammatoire comparable à celle du Diclofénac qui est une substance pharmaceutique classée comme anti-inflammatoire.

**Mots clés :** mucilage, *Lepidium sativum*, inflammation, inhibition des protéines

### **ABSTRACT**

Garden cress (*Lepidium sativum* L.) has many benefits, both nutritional and health, because it is one of the important medicinal plants for the body, which has the ability to treat many diseases, which has led some studies recommend its integration into the diet.

Our work consists in evaluating the anti-inflammatory activity of the mucilage of the seeds of *Lepidium Sativum* L. The therapeutic effects of this plant have been studied by two methods: the protein denaturation inhibition test and the membrane stabilization method HRBC red blood cells. The results obtained show that the mucilage of *L. sativum* exerts a protein denaturation inhibitory power of 105%. In addition, the effect of the stability of red blood cell membranes observed is 68%. It is deduced from the results obtained that the mucilage of *L. sativum* has an anti-inflammatory activity comparable to that of Diclofenac which is a pharmaceutical substance classified as anti-inflammatory.

**Key words:** mucilage, *Lepidium sativum*, inflammation, protein inhibition.

## ملخص

حب الرشاد له العديد من الفوائد الغذائية و الصحية على حد سواء ، لانه من النباتات الطبية المهمة للجسم ، وله القدرة على علاج العديد من الامراض ، مما دفع بعض الدراسات الى التوصية بادماجه في النظام الغذائي. يتمثل عملنا في تقييم النشاط المضاد للالتهابات لصبغ بذور حب الرشاد ، تمت دراسة التأثيرات العلاجية لهذا النبات بطريقتين هما اختبار تثبيط تمسخ البروتين و طريقة تثبيط غشاء خلايا الدم الحمراء . اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان الصمغ في حب الرشاد يمارس قدرة مثبطة لتمسخ البروتين بنسبة % 105 بالاضافة الى ذلك فان تاثير ثبات اغشية خلايا الدم الحمراء هو % 68 .

يستنتج يُستنتج من النتائج التي تم الحصول عليها أن الصمغ في حب الرشاد له نشاط مضاد للالتهابات يضا هي نشاط

Diclofenac

وهو مادة دوائية مصنفة كمضاد للالتهاب

**الكلمات المفتاحية:** الصمغ ، حب الرشاد، الالتهاب ، تثبيط البروتين

**TABLE DES MATIERES**

Dédicace  
Remerciements  
Résumé  
Abstract  
ملخص  
Liste des abréviations  
Liste des tableaux  
Listes des figures  
**Introduction générale.....1**

**Chapitre I : Généralités sur les plantes thérapeutiques**

I.1.Histoire des plantes médicinales.....3  
I.2. La phytothérapie.....3  
    I.2.1. Les avantages de la phytothérapie.....4  
    I.2.2.Limites et risques de la phytothérapie.....4  
        I.2.2.1.Toxicité intrinsèque des plantes.....4  
        I.2.2.2.Effets indésirables.....4  
I.3.1.Définition d'une plante médicinale.....5  
    I.3.2.Généralités sur la plante *Lepidium sativum*.....5  
        I.3.2.1.La famille Brassicaceae (Brassicacées).....5  
        I.3.2.2.Le genre *Lepidium*.....5  
        I.3.2.3.Noms communs.....6  
        I.3.2.4.Classification taxonomique du *L. sativum*.....6  
        I.3.2.5.Description de la plante (*L. sativum*).....7  
        I.3.2.6.Composition chimique du genre *Lepidium*.....8  
I.4. Mucilage.....9  
    I.4.1.Le mucilage de cresson alénois.....9

**Chapitre II : Généralités sur L'Inflammation**

II.1.Définition de l'inflammation.....12  
    II.1.2. Les phases de l'inflammation.....13

## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| II.1.3.Caractérisation de l'inflammation.....      | 14 |
| II.1.4.Etiologie.....                              | 14 |
| II.1.5.Mécanismes de réponse inflammatoire.....    | 15 |
| II.1.6.Initiation de la réponse inflammatoire..... | 16 |
| II.1.6.1. Inflammation aiguë.....                  | 16 |
| II.1.6.2.Inflammation chronique.....               | 16 |
| II.1.7. Résolution de l'inflammation.....          | 17 |

### Chapitre III : Partie expérimentale

|  |    |
|--|----|
| III. Matériels et méthodes.....  | 18 |
| III.1.Introduction.....  | 18 |
| III .2. Matériels.....   | 18 |
| III. 2. 1. Matériel végétal.....   | 18 |
| III. 2.2. Appareillage.....  | 18 |
| III. 2.3. Produits utilisés.....   | 18 |
| III.2. Méthodes.....   | 18 |
| III.2.1. Méthode d'extraction.....   | 18 |
| III.2.1. Extraction du mucilage des graines.....                               | 18 |
| III.3. Détermination de l'Activité Anti-Inflammatoire ( <i>in vitro</i> )..... | 20 |
| III.3.1. Méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines.....            | 20 |
| III.3.2. Méthode de stabilisation membranaire HRBC.....                        | 20 |
| III.3.2.1. Préparation des globules rouges.....                                | 20 |
| III.3.2.2.Hémolyse induite par la chaleur.....                                 | 21 |

### CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

|  |           |
|--|-----------|
| IV.1. Introduction.....  | 22        |
| IV.2. Les caractérisations du mucilage extrait.....                  | 22        |
| IV.3. Activité Anti-inflammatoire in vitro.....                      | 23        |
| IV.3.1. Inhibition de la dénaturation du l'albumine des œufs.....    | 23        |
| IV.3.2. Stabilisation des membranes des globules rouges humains..... | 24        |
| <b>Conclusion.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>Références bibliographiques.....</b>                              | <b>27</b> |
| <b>Annexes.....</b>  | <b>32</b> |



**LISTE DES ABREVIATIONS**

**CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium

**CPA** : Cellules présentatrices d'antigènes

**DO** : Densité optique

**EELS** : Electron energy loss spectroscopy

**eNOS** : NOS endothéliale

**GMP** : Guanosine monophosphate cyclique

**GRH**: Globule rouge humain

**HCl** : Acide chlorhydrique

**HRBC** : Human red blood cell membrane stabilization

**IFN** : Interféron

**IL** : Interleukine

**iNOS** : NOS inductible

**LT** : Les lymphocytes T

**MM** : Médecine moderne

**MT** : Médecine traditionnelle

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NO** : Oxyde nitrique

**NOS** : Oxyde nitrique synthase

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PBS** : Tampon phosphate salin

**Th** : lymphocytes helper

**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1**- Noms communs de *Lepidium sativum* .....6

**Tableau 2**- Classification taxonomique du *L. sativum* .....6

**Tableau 3** - composition chimique de genre *Lepidium*.....8

**Tableau 4**: les différents facteurs de l'inflammation .....14

**Tableau 5** : Caractéristiques organoleptiques du mucilage extrait.....22

**LISTES DES FIGURES**

**Figure 1 :** une inflorescence blanche de *Lepidium sativum* .....6

**Figure 2 :** 2(a) la plante de *lepidium sativum sativum* .....8  
2(b) les graines de *lepidium sativum* ;  
2(c) les graines trempé dans l'eau

**Figure 3 :** le mucilage autour de la graine .....10

**Figure 4 :** Structure de la couche recouvrante la graine.....11

**Figure 5 :** les graines de *lepidium sativum* dans l'eau distillée .....19

**Figure 6 :** 6(a) L'apparition d'une masse coagulante blanche ; .....19  
6(b) La séparation de la masse coagulée du mucilage

**Figure 7:** le mucilage en poudre après le séchage.....23

**Figure 8:** pourcentages d'inhibition de la dénaturation de L'Extrait et Diclofénac.....24

**Figure 9:** Le pourcentage de l'effet hémolytique par HRBC.....25

# **INTRODUCTION GENERALE**

### INTRODUCTION

Depuis des siècles, voire des millénaires, l'homme a appris à connaître les ressources naturelles, et notamment les plantes, pour se nourrir, puis à en cerner les vertus thérapeutiques (Ake, 2011). Actuellement, malgré les progrès en pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très courant, notamment en Pays en voie de développement. Ce volet thérapie concerne la médecine. De la médecine hippocratique (d'Hippocrate à -5e siècle) en passant par celle de Paracelse (+15e siècle) (Daucourt, 2001).

Plusieurs médecines ont contribué à l'établissement de la médecine dite traditionnelle (MT). Cette dernière, jusqu'à nos jours, continue de constituer un vivier non négligeable (Cabalion, 1986 ; Carillon, 2009 ; Juhe et Laine, 2005), pour la médecine conventionnelle notamment la médecine moderne (MM). Très présente de par ses progrès scientifiques remarquables et ses retombées en terme d'offre de soins de santé, cette MM est actuellement lancée dans une course vers les technologies de pointe. Relevons également qu'au fil du temps et selon les espaces, la MT revêt une apparence de persistance et de transcendance.

En fait, sur environ 500 000 espèces, 80 000 a une valeur médicinale. En Afrique, où il y a des herbes encore utilisé pour les soins de santé par de nombreuses populations Les plantes thérapeutiques sont connues empiriquement. Le cresson est l'une des plantes qui a incité les chercheurs à explorer pharmacologiquement ces ressources

En Algérie, la phytothérapie a toujours été utilisée dans le domaine médical traditionnel. Aujourd'hui, les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions thérapeutiques et la vie des habitants, mais les règles d'utilisation font parfois défaut Rigoureux et sans égard aux nouvelles exigences de la thérapie moderne. Ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur le développement de la médecine pour Vérifie l'innocuité et l'efficacité des plantes utilisées et établit des règles scientifiques pour l'utilisation de ces plantes. A cet égard s'inscrit ce travail de recherche dont le but principal est de vérifier les activités anti-inflammatoires, du mucilage d'une plante médicinale appartenant à la famille des brassicaceae du genre *Lepidium*, *Lepidium sativum*.

Les graines de cresson alénois entières sont comestibles. En Inde, on les ajoute à diverses préparations culinaires. Les Indiens leur attribuent plusieurs propriétés médicinales, dont des effets diurétiques, antidiarrhéiques, toniques et... aphrodisiaques. La croyance veut qu'elles soient également efficaces pour combattre le hoquet.

## *Introduction*

---

Certaines parties du grain, dont l'endosperme et le son, contiennent des protéines et des acides gras essentiels, principalement sous forme d'oméga-3 (acide linoléique). Les graines de cresson renferment également plusieurs minéraux comme le potassium, le calcium, le phosphore et le fer. Leur teneur en fibres insolubles est particulièrement élevée. La qualité nutritionnelle des graines de cresson alénois est telle que certains chercheurs croient qu'elles auraient avantage à être exploitées commercialement en tant qu'ingrédient fonctionnel.

**PARTIE I**

**SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

**CHAPITRE I :**

**GENERALITE SUR LES  
PLANTES  
THERAPEUTIQUE**



---

**CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES PLANTES THERAPEUTIQUE****I.1. Histoire des plantes médicinales**

Depuis la nuit des temps, l'homme s'est employé à exploiter la nature pour ses besoins médicaux et alimentaires, et au cours du développement des anciennes civilisations l'exploitation des plantes à usage médicinale s'est développée grâce à leur savoir et à leur expérimentation effectués dans ce domaine. Il a inventorié, déterminé et utilisé les plantes médicinales d'une façon plus ou moins correcte ; mais avec les changements qu'a connus l'humanité au niveau technologique et médicale, le souci d'utilisation des plantes médicinales et aromatiques ne présentait plus un problème concernant les doses utilisées. Mais ceci n'est pas épargné des problèmes d'intoxication que peuvent présenter certaines plantes médicinales concernant l'utilisation non codifiée. Actuellement, cette médication par les plantes connaît un regain d'intérêt notable, grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médical découvre de plus en plus, le bien-fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales (**Lahsissene et al., 2009**).

**I.2. La phytothérapie**

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques: *Phuton* et *therapeia* qui signifie respectivement "plante" et "traitement". La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes (**Wichtl et Anton, 2003**), qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe. Nombreuse plantes contiennent des principes actifs qui peuvent avoir les mêmes propriétés que des médicaments de synthèse. Au contraire de l'allopathie qui utilise des principes actifs purs pour produire des médicaments, la phytothérapie utilise la plante ou ses extraits. Les plantes médicinales sont faciles à utiliser, seraient potentiellement efficaces et peu coûteuses. Le mode de préparation et d'administration sont des facteurs déterminants dans un traitement (**Winters et al., 2003**).

**I.2.1. Les avantages de la phytothérapie**

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, l'homme n'a pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Aujourd'hui, les traitements à base

des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Botineau , 2011**).

### **I.2.2. Limites et risques de la phytothérapie**

**I.2.2.1.Toxicité intrinsèque des plantes :** Toute plante médicinale, dans les conditions normales de son utilisation, est susceptible de faire preuve d'effets secondaires en règle générale indésirables. Dans certaines circonstances, l'usage de plantes peut même être à l'origine d'intoxications. Parfois, ce sont des substances non végétales, contaminant des plantes ou des produits à base de plantes, qui peuvent présenter un risque pour la santé (**Botineau , 2011**).

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux et dont l'utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves voire mortels (**Fournier, 2001**).

Parmi l'ensemble des plantes réputées toxiques, certaines présentent un danger réel en cas d'ingestion alors que d'autres ne provoquent que des troubles mineurs, principalement digestifs. Tous les organes de la plante contiennent les principes toxiques, mais surtout les racines et les graines, renferment des alcaloïdes dits terpéniques dont le principal est l'aconitine qui a une toxicité principalement neurologique et cardiaque (**Flesch, 2005**).

#### **I.2.2.2. Effets indésirables**

Les effets indésirables induits par les plantes médicinales sont rares (**La rousse ; 2001**). Posadzki et ses collaborateurs ont publié en 2013 un article présentant une vue d'ensemble de 50 revues systématiques concernant 50 plantes médicinales différentes, en s'intéressant à leurs effets indésirables : la plupart des plantes médicinales évaluées dans ces revues systématiques étaient associées à des effets indésirables mineurs ou modérés. Il peut s'agir de réactions allergiques, de réactions cutanées type photosensibilisation, ou d'atteintes de différents organes tels que le tractus gastro-intestinal, le foie, les reins, le cœur, le système nerveux central, etc. Nous développerons successivement les réactions allergiques et la photosensibilisation, puis nous étudierons des exemples de plantes hépatotoxiques (ou à hépatotoxicité suspectée), cardiotoxiques et neurotoxiques.

### **I.3.1.Définition d'une plante médicinale**

D'après la définition donnée par l'OMS, une plante médicinale est une plante ou un de ses organes qui contient des substances qui peuvent être employées pour le but thérapeutiques ou qui sont des précurseurs pour la synthèse d'autres drogues utiles et dont ces propriétés

thérapeutiques sont prouvées scientifiquement ou de manière empirique par l'emploi en médecine traditionnelle. Cette guérison est due aux principes actifs que renferment ces plantes. Certes, on constate actuellement un retour vers la nature, un goût prononcé pour tout ce qui est «d'origine naturelle» mais le développement de la phytothérapie est dû à d'autres causes.

### **I.3.2. Généralités sur la plante *Lepidium sativum***

#### **I.3.2.1. La famille Brassicaceae (Brassicacées)**

La famille des Brassicacées, également appelées Crucifères, est une famille de plantes de taille moyenne, dont font partie le chou, le brocoli, le kale ou la moutarde. Le nom Crucifères signifie des pétales en forme de croix. Cette famille contient 372 genres réparties en 4060 espèces différentes. Ce sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou pérennes réparties partout dans le monde. Les feuilles des Brassicacées sont disposées de manière alternée, parfois organisées en rosettes. Les pétales sont au nombre de 4 et sont libres. Ils sont composés de 6 étamines, dont 4 sont aussi longues que les pétales, arrangés en croix, comme les pétales. La pollinisation se fait par des insectes. Le fruit produit est une capsule. Les Brassicacées ont une énorme importance économique puisqu'elles représentent de nombreux légumes.

#### **I.3.2.2. Le genre *Lepidium***

*L. sativum* est une plante très appréciée riche dans une large gamme de métabolites secondaires, y compris les alcaloïdes, les glycosides, les stérols, les tanins, le carotène, les huiles volatiles et fixes ainsi que divers composés phénoliques, y compris les flavonoïdes et les acides phénoliques (Alqahtani et al., 2019). En médecine, l'herbe de cresson a été traditionnellement utilisée dans le traitement de l'asthme, de la toux, de la dysenterie, de l'inflammation de la peau et des yeux, des maladies du sang, de l'inflammation interne et des douleurs rhumatismales (AlJassaci et al., 2016). Alors que, l'extrait aqueux a été signalé à avoir la capacité d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses du sein (Mahassani et Al-Reemi, 2013). Les graines de *L. sativum* ont démontré des activités antioxydantes, analgésiques, anti-inflammatoires et antiarthritiques chez en plus des effets hépato protecteurs (Al-Sheddi et al., 2016).



**Figure 1:** une inflorescence blanche de *Lepidium sativum*

### I.3.2.3.Noms communs

*Lepidium sativum* est connue sous plusieurs noms comme mentionner sur le tableau suivant

:

**Tableau 1-** Noms communs de *Lepidium sativum* (Friedel, 1904).

| langue   | Nom                |
|----------|--------------------|
| Français | Cresson alénois    |
| Français | Passerage cultivée |
| Anglais  | Garden cress       |
| Anglais  | Garden pepperwort  |
| Arabe    | Hab el-rachad      |
| Italie   | Crescione inglese  |

### I.3.2.4.Classification taxonomique du *L. sativum*

**Tableau 2-** Classification taxonomique du *L. sativum* (Raval, 2016)

|                         |                |                     |
|-------------------------|----------------|---------------------|
| <b>Règne :</b>          | <b>Plantae</b> | <b>plantes</b>      |
| <b>Sous-règne :</b>     | Tracheobionta  | Plantes vasculaires |
| <b>Super division :</b> | Spermatophyta  | Spermatophytes      |
| <b>Division :</b>       | Magnoliophyta  | Angiospermes        |

|                      |                       |                     |
|----------------------|-----------------------|---------------------|
| <b>Classe :</b>      | Magnoliopsida         | Dicotylédones       |
| <b>Sous-classe :</b> | Dilleniidae           |                     |
| <b>Ordre :</b>       | Capparales            |                     |
| <b>Famille :</b>     | Brassicaceae          | Famille de moutarde |
| <b>Genre :</b>       | Lepidium              | Herbes poivrées     |
| <b>Espèce :</b>      | Lepidium sativum linn | Cresson de jardin   |

### I.3.2.5. Description de la plante (*L. sativum*)

*L. sativum* est une plante herbacée, dressée, de couleur plus ou moins glauque. Sa tige est glabre, finement striée, profusément ramifiée et pousse jusqu'à 50-80 cm d'hauteur (**Wadhwa et al., 2012**).

**Les feuilles** de *L. sativum* sont alternes, irrégulièrement pinnées, d'environ 12 cm de long et 9 cm de large, avec des pétioles jusqu'à 4 cm de long; des Folioles (5 - 11), en forme ovale ou Oboval, pinnatisect, les lobes ultimes généralement irrégulièrement dentés, faiblement poilus au-dessus, glabres en dessous, feuillettes de feuilles supérieures devenant peu à peu linéaires. Les feuilles supérieures sont généralement simples et linéaires, parfois lobées ou avec dents. Les feuilles basales ont de longs pétioles et une lyreate Pinnatipartite; Les feuilles culinaires sont lancéolées (**Prajapati et al., 2014**).

**Les fleurs** sont bisexuelles, régulières et tétramères: Pédicelle 1.5 - 4.5 mm de long, ascendant; 4 Sépales ovales, 1 - 2 mm de long ; 4 Pétales spatulés à griffe courte jusqu'à 3 mm de long, blanc ou rose pâle; 6 Étamines, anthères habituellement violacées; Ovaires supérieurs, aplatis, aigus marginés, style jusqu'à 0,5 mm de long, stigma capitate (**Prajapati et al., 2014**).

**Le fruit** est une silique aplatie, ronde ou ovale, de 4-6 mm × 3-5,5 mm, de couleur vert pâle à jaunâtre, de marges en forme d'ailes, déhiscent par 2 valves, habituellement avec 2-semées ou graines (**Prajapati et al., 2014**).

**Les graines** de *L. sativum* sont petites, ovales, pointues et triangulaires à une extrémité lisse, d'environ 3-4 mm de long, 1-2 mm de large, de couleur brun rougeâtre. Un sillon présent sur les deux surfaces s'étendant jusqu'à deux tiers vers le bas et une légère aile comme extension présente sur les deux bords de la graine. En trempant dans l'eau la graine se gonfle et se recouvre d'un manteau transparent, incolore, mucilage avec goût mucilagineux (**Prajapati et al., 2014**).



**Figure 2 :** 2(a) la plante de *lepidium sativum* ; 2(b) les graines de *lepidium sativum* ; 2(c) les graines trempé dans l'eau

### I.3.2.6.Composition chimique du genre *Lepidium*

Les tiges et les feuilles de *Lepidium* contiennent des glucosinolates, le composant principal étant la glucotropéoline (benzyl glucosinolate). Distillée à la vapeur, la plante produit environ 0,1% d'huile essentielle incolore, à l'odeur piquante. La graine donne près de 25% d'une huile brun jaunâtre semi-siccative à odeur particulière et déplaisante. L'huile est riche en acides oléique, linoléique et urique, et contient également des alcaloïdes imidazoles. Le tégument de la graine germée contient beaucoup de mucilage, lequel présente une substance allélopathique, le lépidimoïde (Jansen, 2007).

*Lepidium* contient de petites quantités de calcium. Il est toutefois intéressant de souligner que ce calcium est biodisponible, c'est-à-dire qu'une bonne proportion peut être absorbée et utilisée par l'organisme. Le taux d'absorption du calcium présent dans *Lepidium* est de 67%. Certaines parties du grain, dont l'endosperme et le son, contiennent des protéines et des acides gras essentiels, principalement sous forme d'oméga-3 (acide linoléique). Les graines de *Lepidium* renferment également plusieurs minéraux comme le potassium, le calcium le phosphore et le fer. Leur teneur en fibres insolubles est particulièrement élevée. La qualité nutritionnelle des graines de *Lepidium sativum* est telle que certains chercheurs croient qu'elles auraient avantage à être exploitées commercialement en tant qu'ingrédient fonctionnel (Bermejo et al, 2010).

**Tableau 3** - composition chimique de genre *Lepidium* (Bermejo et al., 2010)

| Composants (%) | Lipides (0.7g)                  | Minéraux et oligo-élément ( mg/100g) | Vitamines et assimilés (mg/100g) |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| Protéine : 2.6 | Acides gras saturés :<br>0.023g | Potassium : 606                      | Vitamine A et provitamine        |

|                |                                     |                |                                  |
|----------------|-------------------------------------|----------------|----------------------------------|
|                |                                     |                | A : 346                          |
| Lipides : 0.7  | Acides gras mono-insaturés : 0.239g | Phosphore : 76 | Thiamine (vitamine B1) : 0.08    |
| Glucides : 5.5 | Acides gras poly-insaturés : 0.228g | Calcium : 81   | Riboflavine (vitamine B2) : 0.26 |
| Fibres : 1.1   | Dont oméga : 0.152g                 | Sodium : 14    | Vitamine K : 541.9               |
| Eau : 89.4     | Dont oméga : 3<br>0.076g            | Magnésium : 38 | Vitamine C : 69                  |

#### I.4. Mucilage

##### I.4.1. Le mucilage de cresson alénois

Le cresson alénois a des effets anti-scorbutiques appétissants, diurétiques et purificateurs sanguins, et ses graines sont utilisées comme médicament expectorant (**Behrouzian et al., 2014**).

Le *Lepidium sativum* a été étudié pour son potentiel plus élevé de biosynthèse de mucilage (**Van Oudtshoorn et Van Rooyen, 2013**). Le mucilage de cresson alénois a diverses propriétés médicales telles que des effets antimicrobiens, antiviraux et antibactériens (**Wadhwa et al., 2013**) et des applications industrielles, notamment pharmaceutiques, textiles, cosmétiques, teinture de tissus et fabrication de papier, impression (**Behrouzian et al., 2014**).

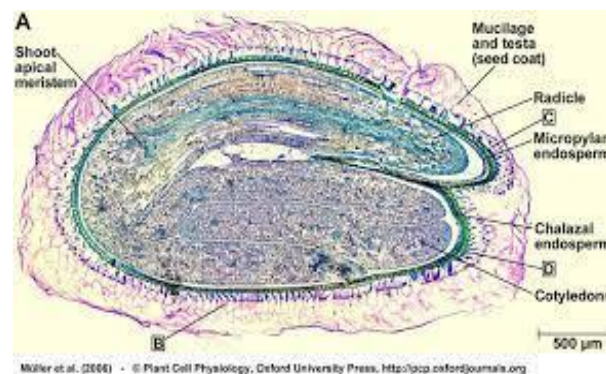


**Figure 3** : le mucilage autour de la graine



Le mucilage de graines de cresson existe dans l'enveloppe le long de la couche externe des graines de cresson alénois (*Lepidium sativum L.*) plante (Fig. 3) (Wadhwa, Panwar, Agrawal, Saini et Patidar, 2012). Les graines se composent de 6,5 à 15 % du mucilage (Divekar, Kalaskar, & Redasani, 2006 ; Karazhiyan, Razavi et Phillips, 2011), qui contient de la cellulose (18,3%) et de l'acide uronique contenant des polysaccharides. L'eau peut ainsi pénétrer entre le polyuronidechaînes, leur permettant de s'hydrater et de gonfler, dispersant ainsimicelles de cellulose. Le gel est un réseau de cellulose hydratée micelles, parsemées de chaînes d'uronides plus fortement hydratées (Sharma & Agarwal, 2011)

Les mucilages végétaux sont également utilisés pour épaissir, lier, désintégrer, émulsifier, suspendre, stabiliser et gélifier. (Malviya, 2011). Ces caractéristiques sont liées à leurs propriétés structurales et leurs fonctions métaboliques dans les aliments, produits pharmaceutiques, cosmétiques, textiles et biomédicaux (Nishinari, Zhang et Ikeda, 2000).



**Figure 4** : Structure de la couche recouvrante la graine. (Wadhwa et al., 2012).

Le mucilage des graines de cresson peut lui-même ou en combinaison avec un autre polymère synthétique peut être utilisé comme nouveau système de délivrance de médicaments. Diffusion de venlafaxine (un médicament antipsychotique) à partir de formulations de gel mucoadhésif buccal préparées en combinant du mucilage de graines de cresson et du carbopol 934P (un polymère pondéral d'acide acrylique réticulé par des éthers alkyliques de saccharose et polymérisé dans le solvant benzène de Lubrizol Inc., Cleveland, États-Unis) a fait l'objet d'une enquête. Mesure de concentration plasmatique moyenne de venlafaxine indique qu'une combinaison du mucilage de graines de cresson et du carbopol 934P entraîne une délivrance prolongée et plus élevée de venlafaxine comparaison avec la solution buvable et l'administration intraveineuse (Nerkar & Gattani, 2012).



Le composant macromoléculaire présente une protéine associée à une conformation de chaîne rigide. Les caractéristiques rhéologiques indiquent une utilisation possible comme nouvel épaississant. La viscosité dynamique de la solution diluée montre un comportement liquide, et à des concentrations plus élevées, des comportements viscoélastiques et de gel (**Karazhiyan et al., 2011b**).

Les gommes de graines deviennent maintenant des additifs importants dans l'industrie alimentaire (**Williams et Phillips, 2000**). La gomme de cresson offre une grande variété d'applications alimentaires en raison de sa limite d'élasticité, de sa pseudoplasticité et de son comportement thixotropique. Il est stable dans les sels (NaCl et CaCl<sub>2</sub>) et sur une large gamme de pH, avec un effet synergique des sucres ajoutés (saccharose et lactose) sur son comportement d'écoulement.

# **CHAPITRE II :**

## **GENERALITES SUR L'INFLAMMATION**

---

**CHAPITRE II : GENERALITES SUR L'INFLAMMATION****II.1. Définition de l'inflammation**

L'inflammation est un mécanisme de défense immunologique déclenché en réponse à des blessures mécaniques, des brûlures, des infections microbiennes, allergènes et autres stimuli nocifs (Yoon et Baek, 2005). Il est un processus biologique hautement régulé qui permet au système immunitaire pour éliminer efficacement les stimuli nuisibles et initier le processus de guérison (Kular *et al.*, 2011; Stables et Gilroy, 2011).

L'inflammation est la réponse du système immunitaire aux stimuli nocifs, tels que les agents pathogènes, les cellules endommagées, les composés toxiques ou l'irradiation (Medzhitov, 2010) et agit en éliminant les stimuli nuisibles et en initiant le processus de guérison (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007). L'inflammation est donc un mécanisme de défense indispensable à la santé (Habituellement, pendant les réponses inflammatoires aiguës, les événements et les interactions cellulaires et moléculaires minimisent efficacement les blessures ou les infections imminentes. Ce processus d'atténuation contribue à la restauration de l'homéostasie tissulaire et à la résolution de l'inflammation aiguë. Cependant, une inflammation aiguë non contrôlée peut devenir chronique, contribuant à une variété de maladies inflammatoires chroniques (Zhou *et al.*, 2016).

L'inflammation est l'une des réponses orchestrées par le système immunitaire en réponse à une attaque. Le système immunitaire est l'ensemble des mécanismes biologiques mis en place par l'organisme pour maintenir la cohésion et l'intégrité des cellules et des tissus qui le composent. Ceci est accompli en partie en éliminant les produits chimiques étrangers et les agents infectieux auxquels il est exposé, et en partie en éliminant les cellules endommagées et en limitant la prolifération des cellules cancéreuses.

L'efficacité du système immunitaire repose tout d'abord sur sa capacité à distinguer le soi du non-soi afin de reconnaître les agressions auxquelles l'organisme est confronté. En découle alors la mise en place des mécanismes de défense que sont l'immunité innée, réaction immédiate mais non spécifique, et l'immunité adaptative, plus tardive mais spécifiquement dirigée comme l'antigène à éliminer.

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'organisme. Le premier mécanisme mis en place est la barrière que constitue le revêtement cutané-muqueux dont

l'efficacité physique est renforcée par des facteurs mécaniques d'expulsion, la production de facteurs bactéricides et une barrière biologique constituée de la flore bactérienne saprophyte non pathogène en compétition métabolique et physique avec les pathogènes externes. En cas de dommage du revêtement cutanéomuqueux, il y a passage des agents infectieux dans l'organisme et instauration d'une réponse inflammatoire.

### **II.1.2. Les phases de l'inflammation**

L'inflammation est un processus le plus souvent aigu et localisé, ayant pour but de détruire ces éléments étrangers grâce à l'activation d'un certain nombre de médiateurs moléculaires et cellulaires. Elle est caractérisée par trois phases : vasculaire, cellulaire et de résolution.

Au cours de la phase vasculaire, l'augmentation du flux sanguin, suite à la sécrétion de médiateurs vasoactifs tels que l'histamine ou la sérotonine par les mastocytes et les basophiles présents, provoque rougeur et chaleur. L'augmentation de la perméabilité des capillaires permet, en induisant un œdème, le passage du plasma au niveau du foyer inflammatoire et favorise sa dilution. La vasodilatation brutale de la microcirculation locale, associée à la sécrétion de médiateurs moléculaires et à l'expression de molécules d'adhésion permet le recrutement des phagocytes circulants qui, grâce à leur adhésion aux cellules endothéliales, traversent les parois vasculaires par diapédèse.

La phase suivante est alors la phase cellulaire, caractérisée par la mobilisation des phagocytes circulants (neutrophiles, monocytes et macrophages) et la production de médiateurs solubles tels que les protéines du système du complément, les protéines de la phase aiguë de l'inflammation et les cytokines. Les neutrophiles et les macrophages, dont la fonction essentielle est la phagocytose, permettent l'élimination des pathogènes.

Si la réponse innée n'est pas suffisante pour lutter efficacement contre les pathogènes, la mise en place de la réponse immunitaire adaptative spécifique est alors nécessaire. En tant que cellules présentatrices d'antigène (CPA), les cellules dendritiques et les macrophages activent les lymphocytes T (LT) CD4 en leur présentant les antigènes issus de la dégradation du pathogène. Ces LT se différencient en lymphocytes helper « Th » producteurs de cytokines. En fonction de la nature de l'antigène, deux types de réponses peuvent être mis en œuvre :

- La réponse à médiation cellulaire est basée sur la reconnaissance de cellules du soi et permet ainsi l'élimination de cellules infectées ou tumorales, grâce à l'intervention des LT cytotoxiques CD8. Les Th1, obtenus grâce à l'interaction directe avec les CPA ou en réponse au

à l'interleukine (IL)-12 et à l'interféron (IFN)- $\gamma$  et caractérisés par la production d'IL2, ont pour rôle d'activer les LT cytotoxiques CD8 induisant l'apoptose des cellules cibles.

- La réponse à médiation humorale est basée sur la reconnaissance d'agents exogènes. L'activation des lymphocytes B par les Th2 producteurs d'IL4 et d'IL13, différenciés en réponse à l'IL4 ou à l'interaction avec les CPA, permet la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes. Ces anticorps sont alors impliqués dans la neutralisation des bactéries, virus et toxines, par la formation des complexes immuns qui facilitent la phagocytose par les macrophages, l'activation de l'immunité cellulaire et l'activation du complément.

Enfin, suite à l'élimination de l'agression, la phase de résolution de l'inflammation a pour but de restaurer des conditions physiologiques. Celle-ci se caractérise par la diminution de la production de médiateurs pro-inflammatoires, notamment grâce à la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10 et de glucocorticoïdes par les glandes surrénales, ainsi que l'élimination de l'infiltrat leucocytaire.

Cette phase de résolution est associée à un processus de réparation tissulaire. En cas d'inflammation modérée et contrôlée, l'architecture et la fonction tissulaire peuvent être restaurées. Cependant, il est possible que la phase de résolution de l'inflammation ne soit pas efficace. Cela conduit alors à l'installation d'une inflammation chronique. En plus de l'aspect inflammatoire principalement conduit par les macrophages, celle-ci se caractérise notamment par une transition épithélio-mésenchymateuse conduisant à l'activation des fibroblastes responsables du développement et de la progression d'une réparation tissulaire dérégulée, se traduisant par l'apparition de fibrose.

### II.1.3. Caractérisation de l'inflammation

Au niveau tissulaire, l'inflammation se caractérise par une rougeur, un gonflement, une chaleur, une douleur et une perte de fonction tissulaire, qui résultent de réponses cellulaires immunitaires, vasculaires et inflammatoires locales à une infection ou à une blessure (**Takeuchi et pattern, 2010**). Les événements microcirculatoires importants qui se produisent au cours du processus inflammatoire comprennent les modifications de la perméabilité vasculaire, le recrutement et l'accumulation de leucocytes et la libération de médiateurs inflammatoires (**Ferrero et al., 2007**).

### II.1.4. Etiologie

Divers facteurs pathogènes, tels qu'une infection, une lésion tissulaire ou un infarctus cardiaque, peuvent induire une inflammation en provoquant des lésions tissulaires. Les étiologies de l'inflammation peuvent être infectieuses ou non infectieuses (Tableau1). En réponse à une lésion tissulaire, le corps déclenche une cascade de signalisation chimique qui stimule les réponses visant à guérir les tissus affectés. Ces signaux activent la chimiotaxie leucocytaire de la circulation générale vers les sites de lésions. Ces leucocytes activés produisent des cytokines qui induisent des réponses inflammatoires (**Jabbour et al., 2009**).

**Tableau 4:** les différents facteurs de l'inflammation :

| <b>Facteurs non infectieux</b>   | <b>Facteurs infectieux</b>                |
|--|---|
| Physique : brûlure, engelure, blessure physique, corps étranger, traumatisme, radiation ionisante<br>Chimique : glucose, acides gras, toxines, alcool, irritants chimiques (dont fluorure, nickel et autres oligo-éléments)<br>Biologique : cellules endommagées<br>Psychologique : excitation | Bactéries, virus, autres micro-organismes |

### II.1.5.Mécanismes de réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est l'activation coordonnée des voies de signalisation qui régulent les niveaux de médiateurs inflammatoires dans les cellules tissulaires résidentes et les cellules inflammatoires recrutées dans le sang (**lawrence, 2009**). L'inflammation est une pathogénèse courante de nombreuses maladies chroniques, notamment les maladies cardiovasculaires et intestinales, le diabète, l'arthrite et le cancer (**Libby, 2007**). Bien que les processus de réponse inflammatoire dépendent de la nature précise du stimulus initial et de sa localisation dans le corps, ils partagent tous un mécanisme commun, qui peut être résumé comme suit :

1. les récepteurs de surface cellulaire reconnaissent les stimuli nuisibles
2. les voies inflammatoires sont activées
3. les marqueurs inflammatoires sont libérés
4. les cellules inflammatoires sont recrutées.

Ce processus comprend :

- **des phénomènes généraux**, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable, le plus souvent par de la fièvre et éventuellement une altération de l'état général :

• **des phénomènes locaux** : l'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète.

Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire, mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation. L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation.

### **II.1.6. Initiation de la réponse inflammatoire**

L'inflammation est une réponse à une infection, à une provocation antigénique ou à une lésion tissulaire conçue pour éradiquer les microbes ou les irritants et pour potentialiser la réparation des tissus. Une inflammation excessive peut cependant entraîner des lésions tissulaires et, si elle est grave, entraîner une décompensation physiologique, un dysfonctionnement des organes et la mort. L'inflammation peut être divisée en deux grandes catégories - aiguë et chronique - en fonction du moment et des caractéristiques pathologiques (**Liew, 2003**)

#### **II.1.6.1. Inflammation aiguë**

Les processus pathologiques causés par une inflammation aiguë présentent certains des problèmes de gestion les plus intenses pour les anesthésiologistes et les praticiens des soins intensifs. La septicémie, les traumatismes graves et les chirurgies majeures ont tous des composantes inflammatoires aiguës majeures. L'inflammation aiguë est généralement d'une durée relativement courte (de quelques heures à quelques jours) et se caractérise par une vasodilatation, l'exsudation de liquide riche en protéines (plasma) et une migration de cellules (principalement des neutrophiles) vers le site de la lésion et, dans certains cas, une activation de la cascade de coagulation (**Splettstoesser et al., 2002; Carraway et al., 2003**)

#### La vasodilatation :

La vasodilatation est une caractéristique classique de l'inflammation aiguë et se caractérise cliniquement par une rougeur et une chaleur au site de la blessure. Le but de la réponse vasodilatatrice est de faciliter la délivrance locale de médiateurs solubles et de cellules inflammatoires. La vasodilatation induite par l'inflammation est médiée principalement par l'oxyde nitrique (NO) et les prostaglandines vasodilatatrices. Le NO est produit à partir de la L-

arginine par l'action de l'oxyde nitrique synthase (NOS). Trois isoformes de NOS ont été identifiées. La NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS) sont produites de manière constitutive et leur expression est augmentée par le flux de calcium. Les leucocytes activés produisent une NOS inductible (iNOS) après exposition à des produits microbiens ou à des cytokines pro-inflammatoires (**Vallance et al., 2001**). Le NO produit provoque une relaxation ultérieure des muscles lisses par le biais de mécanismes cycliques dépendants du GMP. Les principales prostaglandines vasodilatatrices sont la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> et PGF<sub>2</sub>.

### II.1.6.2. Inflammation chronique

Les maladies inflammatoires chroniques comprennent la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, la silicose, l'athérosclérose et les maladies intestinales inflammatoires. Ces troubles se caractérisent par une durée prolongée (semaines, mois ou années) pendant laquelle l'inflammation, la destruction des tissus et les tentatives de réparation des tissus se produisent simultanément (**Liew, 2003**). L'infiltration de cellules mononucléaires et la fibrose sont des caractéristiques histologiques typiques de l'inflammation chronique (**Davis et al., 2003**). Les maladies inflammatoires chroniques posent souvent des défis de gestion aux anesthésiologistes.

### II.1.7. Résolution de l'inflammation

Pour empêcher la progression d'une inflammation aiguë vers une inflammation chronique persistante, la réponse inflammatoire doit être supprimée pour éviter des lésions tissulaires supplémentaires. La résolution de l'inflammation est un processus bien géré impliquant la production spatialement et temporellement contrôlée de médiateurs, au cours de laquelle les gradients de chimiokines sont dilués dans le temps. Les globules blancs circulants ne détectent finalement plus ces gradients et ne sont pas recrutés sur les sites de blessure. La dérégulation de ce processus peut entraîner une inflammation chronique incontrôlée (**Headland et Norling, 2015**). Les processus de résolution de l'inflammation qui rectifient l'homéostasie tissulaire comprennent la réduction ou l'arrêt de l'infiltration tissulaire par les neutrophiles et l'apoptose des neutrophiles épuisés, la contre-régulation des chimiokines et des cytokines, la transformation des macrophages de cellules activées de manière classique en cellules activées alternativement et l'initiation de la guérison (**Reville et al., 2006; Serhan et al., 2005**).



# **PARTIE II**

## **LA PARTIE EXPERIMENTALE**

**CHAPITRE III**

**MATERIEL ET**

**METHODES**

---

## CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

### III.1. Introduction

La partie expérimentale de ce travail s'est déroulée pendant une période de trois mois (allant du mois de Mars au mois de Mai 2022), afin d'étudier quelques activités biologiques de l'espèce *lepidium sativum*.

Mon étude a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.

### III .2. Matériels

#### III. 2. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans le cadre de ce travail, est constitué par les graines de l'espèce *lepidium sativum*. Les graines ont été achetées dans la région de Mostaganem, situé à l'ouest d'Algérie.

#### III. 2.2. Appareillage

- ✓ Spectrophotomètre ( Jenway 6715)
- ✓ Etuve (Memmert NB400)
- ✓ pH mètre (Adwa)
- ✓ Centrifugeuse (Sigma)
- ✓ Agitateur magnétique (Stuart)

#### III. 2.3. Produits utilisés

- ✓ Acétone
- ✓ Solution PBS
- ✓ Solution d'Alsever
- ✓ Albumine des œufs
- ✓ Diclofénac
- ✓ HCl

### III.2. Méthodes

#### III.2.1. Méthode d'extraction

##### III.2.1. Extraction du mucilage des graines

Précipitation de graines trempées et mélangées dans l'acétone :

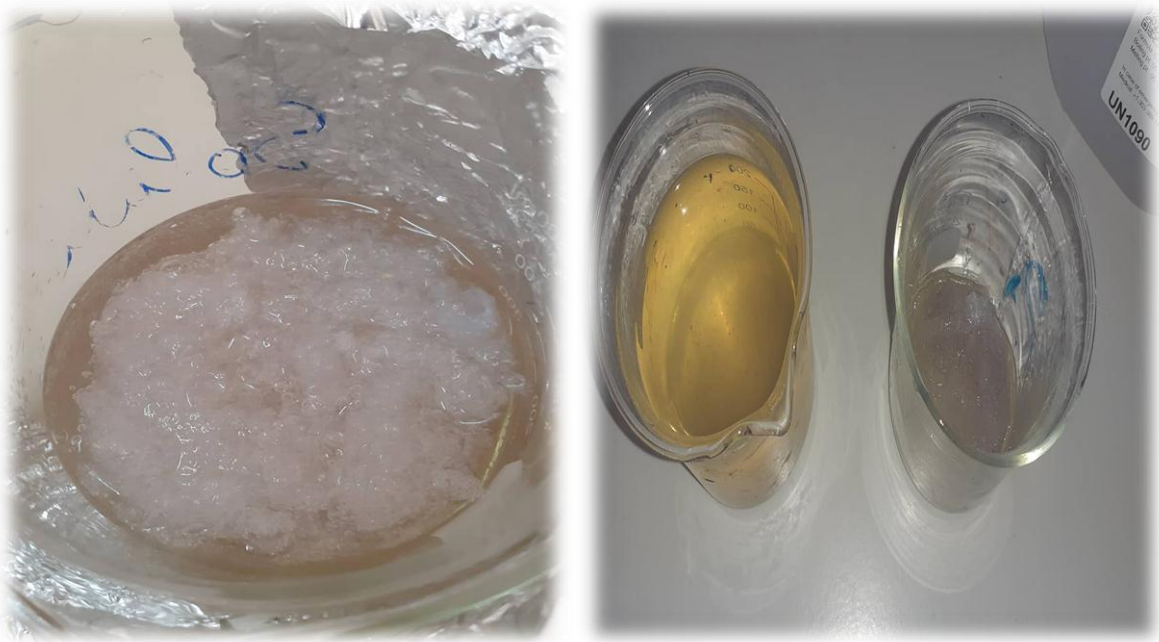
Les graines de *Lepidium sativum* contiennent du mucilage autour de la couche externe. Le problème majeur de l'isolement du mucilage est qu'il gonfle mais ne se sépare pas facilement des graines (Patel *et al.*, 2011).



**Figure 5 :** les graines de *lepidium sativum* dans l'eau distillée

Environ 100 g de graines de *Lepidium sativum* ont été trempés dans 800ml d'eau distillée pendant 12 heures. Les graines trempées ont été mélangées pendant 15 minutes à environ 2000 rpm à l'aide du mixeur manuel Phillips HR 1453. Mélangeur à main Phillips HR 1453. Les graines mélangées ont ensuite été filtrées à travers un tissu de mousseline. 200ml d'eau supplémentaire ont été ajoutés aux graines et à nouveau mélangées et filtrées à nouveau à travers une toile de mousseline pour obtenir le rendement maximal. Une quantité équivalente d'acétone a été ajoutée pour permettre la précipitation de la protéine.

La masse coagulante blanche surnageante séparée après la précipitation par l'acétone a été filtrée à travers la toile de mousseline. Le mucilage précipité a été ensuite étalé sur une plaque de verre et séché dans l'étuve à une température ne dépassant pas 60°C pendant 16 heures.



**Figure 6 :** 6(a) L'apparition d'une masse coagulante blanche ; 6(b) La séparation de la masse coagulée du mucilage

Le mucilage séché se sépare facilement sous forme de flocons sur une plaque de verre en pulvérisant de l'acétone sur le mucilage séché. Les flocons de mucilage ont été encore séchés à 60°C pendant 5 minutes. Le mucilage obtenu a été transformé en poudre par réduction de taille. La poudre obtenue a été tamisée à l'aide d'un tamis (Vaishali et Neeta, 2014).

### III.3. Détermination de l'Activité Anti-Inflammatoire (*in vitro*)

#### III.3.1. Méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'EELS a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. La méthode consiste à préparer trois solutions.

- La solution d'échantillon : (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse d'albumine des œufs et 0,05 ml d'extrait aqueux
- Solution témoin : (0,5 ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse d'albumine des œufs et 0,05 ml d'eau distillée
- La solution standard : (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse d'albumine des œufs et de la solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 100 mg.

Toutes les solutions ont été ajustées à un pH de 6,3 par une solution d'HCl. Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 20 min, ensuite la température était augmentée pour

garder les échantillons à 57° cependant 3 min. après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution tampon phosphate saline (PBS) à (Ph=6,3) ont été ajoutés aux solutions préparées. L'absorbance a été lue par le spectrophotomètre à 660 nm. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - [(D.O \text{ de l'échantillon} - D.O \text{ du témoin} / D.O \text{ du témoin})] * 100$$

### III.3.2. Méthode de stabilisation membranaire HRBC

#### III.3.2.1. Préparation des globules rouges

Le sang (10ml) a été prélevé chez un humain en bonne santé qui n'a pris aucun médicament anti-inflammatoire. Le sang prélevé a été mélangé avec un volume égal de solution d'Alsever stérilisée (2 % de dextrose, 0,8 % de citrate de sodium, 0,05 % d'acide citrique et 0,42 % de chlorure de sodium dans l'eau). Le mélange a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 minutes et les cellules emballées ont été utilisées directement.

#### III.3.2.2. Hémolyse induite par la chaleur

Le principe en jeu ici est la stabilisation de la lyse de la membrane HRBC induite par une hypotonie. Le mélange d'essai contenait l'extrait (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml)/diclofénac - médicament standard à base de sodium (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg/ml), 1 ml de tampon phosphaté (0,15 M, pH 7,4), 2 ml d'hyposaline (0,36 %), 0,5 ml de HRBC, ont été incubés à 37 °C pendant 30 min et centrifugés pendant 20 min à 3 000 tr/min. La teneur en hémoglobine de la suspension a été estimée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Yoganandam *et al.*, 2010).

Le pourcentage d'hémolyse produit en présence d'eau distillée a été mesuré à 100 %.

**CHAPITRE IV :**

**RESULTATS ET**

**DISCUSSION**

## CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Le but de la présente étude était d'évaluer l'activité anti-inflammatoire in vitro du mucilage des graines de *lepidium sativum* par la méthode de dénaturation des protéines (l'albumine d'œuf) et méthode de la stabilisation des membranes des GRH.

### IV.1. Les caractérisations du mucilage extrait

Le mucilage est isolé par dissolution l'eau et précipitant dans 90% d'acétone et séché à température ambiante. Les résultats relatifs aux propriétés organoleptiques du mucilage obtenu sont représentés dans le tableau 5. L'aspect du mucilage obtenu est illustré dans la figure 8.

L'étude morphologique et physique évaluative du mucilage isolé montre, qu'il est sous forme d'une poudre blanche brunâtre, avec une odeur caractéristique. Dissout dans l'eau, il donne une solution colloïdale neutre ; il est soluble dans l'eau chaude, pratiquement insoluble dans l'éthanol, l'acétone, l'éther et le chloroforme. Des caractéristiques similaire sont mises en évidence par l'étude de **Hadian et al. (2019)**.

**Tableau 5** : Caractéristiques organoleptiques du mucilage extrait des graines de *L. sativum*

| Propriétés |                        |
|------------|------------------------|
| Apparence  | Poudre amorphe lustrée |
| Couleur    | Blanche brunatre       |
| Odeur      | Odeur caractéristique  |
| Gout       | Insipide               |





**Figure 7:** le mucilage en poudre après le séchage

## **IV.2. Activité Anti-inflammatoire in vitro**

### **IV.2.1. Inhibition de la dénaturation de l'albumine des œufs**

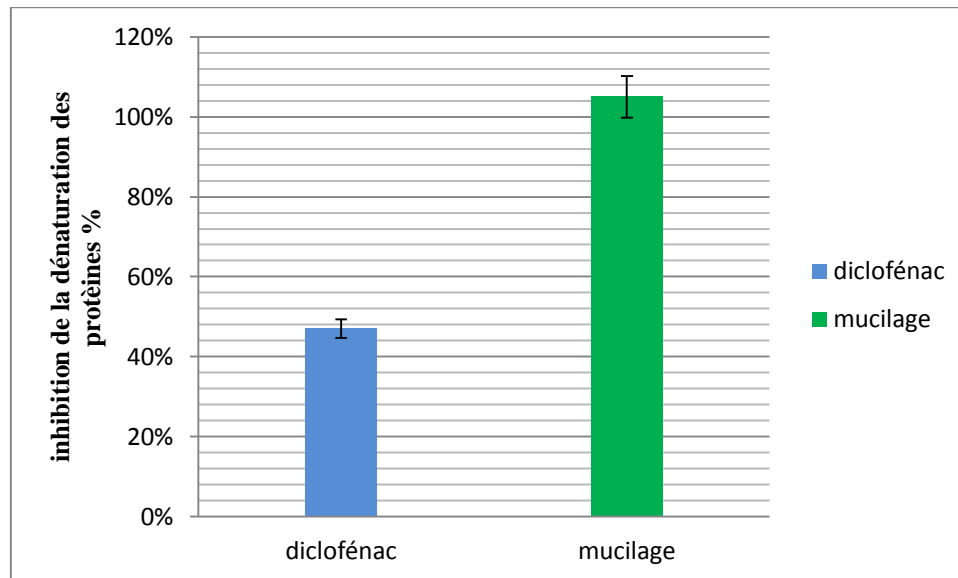
La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Bagad et al., 2011 ; Falcão et al., 2016**).

Les méthodes actuelles, pour détecter et isoler une large gamme de composés anti-inflammatoires aux premiers stades du processus de découverte de médicaments, utilisent un grand nombre d'animaux. A ce propos, Il existe des problèmes éthiques concernant l'utilisation d'animaux aux premiers stades de découverte de médicaments pour les maladies inflammatoires et dégénératives, à partir de produits naturels, utilisant les voies d'isolement dictées par l'activité lorsque de nombreux composés, supérieurs à 100, sont présents dans l'extrait brut ou fraction (**Abdullahi et al., 2013 ; Bakchiche et Gherib, 2014**).

C'est la raison principale pour laquelle il est proposé la méthode d'utilisation des effets anti-dénaturation (stabilisation) in vitro de l'albumine d'œuf, traitées thermiquement (immunogènes), en tant que test de dépistage pour la détection des composés anti-inflammatoires, sans l'utilisation d'animaux aux premiers stades du processus de découverte de médicaments (**Chaouche et al., 2014 ; Williams et al., 2009**).

La figure 9 montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro du mucilage de *Lepidium sativum* qui consiste à évaluer le taux d'inhibition de la dénaturation de l'albumine des œufs. D'après les résultats nous avons observé un rapprochement de taux d'inhibition de la dénaturation de l'albumine des œufs entre l'anti inflammatoire standard (diclofénac sodium) et le mucilage étudié

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines obtenu par notre mucilage était efficace avec une inhibition égale à 105%. Les résultats obtenus pour cet extrait sont meilleurs à obtenus pour le diclofénac, un médicament anti-inflammatoire utilisé comme standard qui a affiché un pourcentage d'inhibition de 47% à la même concentration.



**Figure 8:** pourcentages d'inhibition de la dénaturation du mucilage et du Diclofénac.

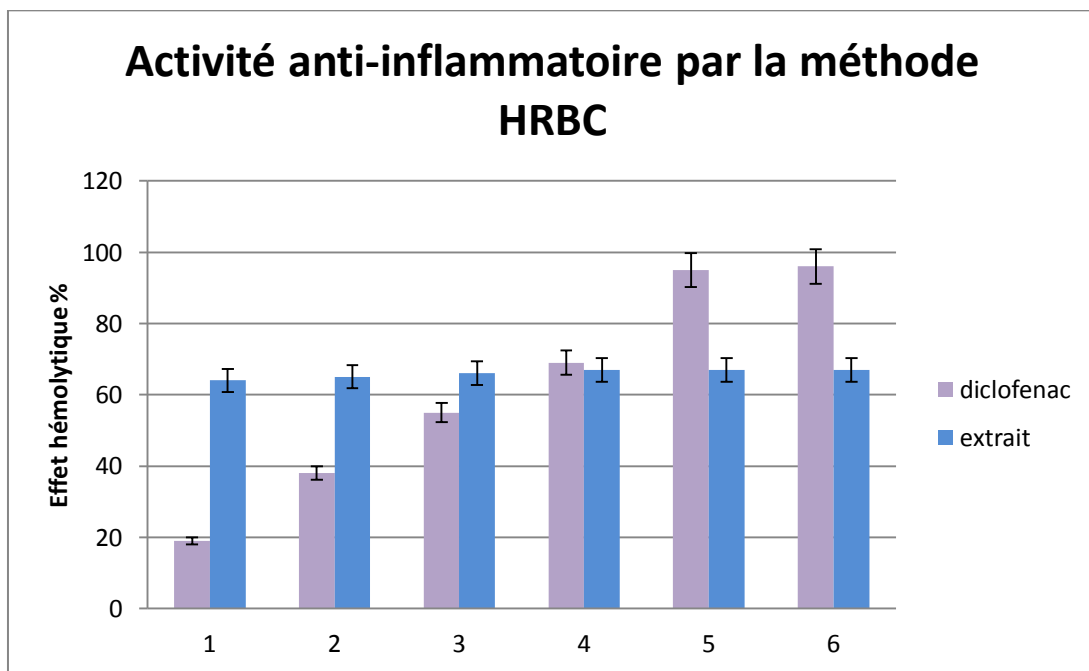
#### IV.3.2. Stabilisation des membranes des globules rouges humains

L'activité anti-inflammatoire du mucilage a été réalisée pour explorer sa bio efficacité. L'étude a été prise méthode de stabilisation de la membrane HRBC pour le dépistage de l'activité (Bruton *et al.*, 2005).

Les résultats relatifs à la stabilisation des membranes des globules rouges sont illustrés dans la figure 10. Les pourcentage de la stabilisation des membranes des globules rouges à des concentrations de 50, 100, 250, 500, 1000 et 2000  $\mu\text{g/ml}$  du mucilage ont montré des valeurs de 64, 65, 66, 67, 67 et 68% respectivement. Alors que les pourcentages de stabilisation membranaires obtenus par les memes concentrations de diclofénac sont à l'ordre de 19, 38, 55, 69, 95 et 96 % respectivement

La méthode de la stabilisation des membranes des GRH a été choisie pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire du mucilage de *Lepidium sativum* in vitro car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomiale et sa stabilisation implique que le sirop peut ainsi stabiliser les membranes lysosomiales. La stabilisation de la membrane lysosomiale

est importante dans la limitation de la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosomiques des neutrophiles activés tels que les protéases qui provoquent une inflammation des tissus et d'autres dommages lors de la libération extracellulaire (Shendkar *et al.*, 2014). L'hémolyse induite par l'hypotonie peut découler de la lyse des cellules en raison de la perte de pression osmotique du liquide intracellulaire et des composants électrolytiques. L'extrait peut inhiber les processus (Suresh *et al.*, 2014).



**Figure 9:** Le pourcentage de l'effet hémolytique par HRBC

Certains médicaments anti-inflammatoires ont montré une capacité dépendante de la dose à inhiber la dénaturation des protéines. Des résultats similaires ont été observés à partir de nombreux extraits de plantes (Sakat *et al.*, 2010). D'après les résultats de la présente étude, on peut affirmer que le mucilage de *lepidium sativum* est capable d'inhiber la dénaturation de la protéine dans les maladies inflammatoires.

# CONCLUSION

### CONCLUSION

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques, ce qui nous amène à la conservation de la biodiversité végétale locale. Et comme la phytothérapie suscite un renouveau d'intérêt, nous sommes intéressés dans ce travail à l'effet du mucilage des graines de *Lepidium sativum* et son activité anti-inflammatoire.

Les plantes anti-inflammatoires regroupent des espèces de diverses familles dont les principes actifs présumés responsables de l'activité anti-inflammatoire sont de nature chimique variée. Cependant ces plantes ont toutes en commun la présence de composés phénoliques, ceux-ci formant un ensemble très vaste incluant les flavonoïdes, les coumarines, les tanins et les acides phénols auxquels appartiennent les dérivés de l'acide salicylique.

Au cours de notre travail, nous avons déterminé l'activité anti-inflammatoire du mucilage des graines de *L. sativum* par la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines et par la méthode HRBC.

Tout d'abord, et après l'extraction du mucilage à partir des graines de *L. sativum*, nous avons commencé par le test de la détermination du pourcentage d'inhibition des protéines, ensuite on a exploré le test de la stabilité des membranes des globules rouges HRBC.

Notre mucilage montre une activité inhibitrice de dénaturation de protéines avec un pourcentage de 105 % et un effet anti-hémolytique comparée à celle obtenue par le diclofénac . On constate donc que le mucilage *L. sativum* exerce une activité anti-inflammatoire.

En perspectives, des études supplémentaires sont nécessaire pour l'exploration des effets thérapeutiques du mucilage des graines de *L. sativum*.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES

1. Abdullahi MN., Ilyas N., Ibrahim H. Evaluation of phyto-chemical screening and analgesic activity of aqueous extract of the leaves of *Microtrichia perotitii* dc (Asteraceae) in mice using hotplate method. *Med Plant Res* 2013;3: 37-43
2. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS let.* 2007;581:3723–3733.
3. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2:675–680.
4. Al-jassaci, m.j., mohammed, g.j., hameed, i.h., 2016. Secondary metabolites analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and evaluation of antibacterial activity. *International Journal of pharmacology and clinical research* 8, 304–315.
5. Alqahtani, f.y., aleanizy, f.s., mahmoud, a.z., farshori, n.n., alfaraj, r., al-sheddi, e.s., Alsarra, i.a., 2019. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory Activities of *lepidium sativum* seed oil. *Saudi journal of biological sciences* 26, 1089–1092.
6. Al-sheddi, e.s., farshori, n.n, al-oqail, m.m., musarrat, j., al-khedhairy, a.a., Siddiqui, m.a., 2016. Protective effect of *lepidium sativum* seed extract against Hydrogren peroxide-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver cells (hepg2). *Pharmaceutical biology* 54, 314–321.
7. Bagad, Y.M., Umalkar, A.R., Tati, A.U., Surana, S.J. (2011). Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Bridelia airyshawii* (Euphorbiaceae). *J. Pharm. Res.*:4(5);1326- 1332.
8. Bakchiche B., Gherib A. Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie [Antioxidant activities of polyphenol extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia]. *Int J Innovation Applied Studies* 2014;9: 167-72.
9. Behrouzian et al., 2014 F. Behrouzian, S.M. Razavi, G.O. Phillips Cress seed (*Lepidium sativum*) mucilage, an overview *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre*, 3 (2014), pp. 17-28
10. Botineau m, ( 2011) guide des plantes médicinales. Paris : belin, 2011. Page239.
11. Brusselle G, Bracke K. Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Annals American Thoracic Society.* 2014;11:S322–S328.
12. Bruton LL. Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics. 11th Ed. USA: McGraw Hill; 2005, p. 1102-1104.

13. Carraway MS, Welty-Wolf KE, Miller DL et al. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003; 167: 1200–1209.
14. Chaouche TM., Haddouchi F., Ksouri R., AtikBekkara F. Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *J Chinese Med Assoc* 2014;77: 302-7.
15. Chertov O, Yang D, Howard O, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev.* 2000;177:68–78.
16. Chi, Z., Liu, R., You, H., Ma, S., Cui, H., Zhang, Q., 2014. Probing the in vitro cytotoxicity of the veterinary drug oxytetracycline. *PloS One* 9, e102334
17. Czerkies M, Kwiatkowska K. Toll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: Focus on TLR4 Activation by Lipopolysaccharide. *Adv Cell Biol.* 2014;4:1–23.
18. Davies DE, Wicks J, Powell RM et al. Airway remodeling in asthma: new insights. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 111: 215–225.
19. F. J, «influence de l'oxygène sur le verdissement,» chez bulletin de la société botanique de france, paris, 1904, pp. 100-103.
20. Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R.(2016).Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.*:111;61–66
21. Ferrero-Miliani L, Nielsen O, Andersen P, Girardin S. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clin Exp Immunol.* 2007;147:227–235.
22. Flesch F. (2005). Intoxication d'origine végétale plant poisoning F.Flesch (Praticien hospitalier) Centre antipoison, hopitaux universitaires de Strasbourg.
23. Fournier P. (2001). Les quatres flores de France. Lachevalier. Paris. Vol II.2.
24. Gudkov AV, Komarova EA. p53 and the Carcinogenicity of Chronic Inflammation. *CSH Perspect Med.* 2016
25. Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol.* 2015;27:149–160.
26. Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reprod.* 2009;138:903–919
27. Janeway CA, Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu rev of immunol.* 2002;20:197–216.
28. jansen, prota network office europe, wageningen, netherlands: wageningen university, 2007



29. Karazhiyan, H., Razavi, S. M. A., Phillips, G. O., Fang, Y., Al-Assaf, S., & Nishinari, K. (2011b). Physicochemical aspects of hydrocolloid extract from the seeds of *Lepidium sativum*. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1066–1072.
30. Kular, L., Pakradouni, J., Kitabgi, P., Laurent, M., Martinerie, C., 2011. The CCN family: a new class of inflammation modulators? *Biochimie* 93, 377–388
31. L. J. Bermejo j.e. hernandez, «neglected crops: 1492 from a different perspective: garden cress,» fao corporate document repository, 2010.
32. Lahsissene h., kahouadji a., tijane m., et hseini s., 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de zaër (maroc occidental). *Lejeunia*, 186, 1- 2.
33. Lawrence T. The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *CSH Perspect Biol.* 2009
34. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65:S140–S146.
35. Liew FY. The role of innate cytokines in inflammatory response. *Immunology Letters* 2003; 85: 131–134.
36. Mahassni, s.h., al-reemi, r.m., 2013. Cytotoxic effect of an aqueous extract of *lepidium Sativum* l. Seeds on human breast cancer cells. *Indian journal of traditional knowledge* 12, 605–614.
37. Malviya, R. (2011). Extraction characterization and evaluation of selected mucilage as pharmaceutical excipient. *Polimery w Medycynie*, 41, 3.
38. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010;140:771–776.
39. Moncada S, Palmer RM & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991; 43: 109–142
40. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell.* 2010;140:871–882.
41. Nerkar, P. P., & Gattani, S. G. (2012). Cress seed mucilage based buccal mucoadhesive gel of venlafaxine: in vivo, in vitro evaluation. *Journal of Materials Science*, 23, 771–779.
42. Nishinari, K., Zhang, H. B., & Ikeda, S. (2000). Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 195–201
43. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *P Natl Acad Sci.* 2000;97:13766–13771.
44. Prajapati v. D., maheriya p.m., jani g.k., patil p.d., patel b.n. (2014) *lepidium sativum* linn: a current addition to the family of mucilage and its applications. *International journal of biological macromolecules*, 65: 72-80.

45. Raval, n. (2016) a comprehensive review of lepidium sativum linn, a traditional medicinal plant. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5 (5): 1593-1601.
46. Reville K, Crean JK, Vivers S, Dransfield I, Godson C. Lipoxin A4 redistributes myosin IIA, Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *Jof Immunol*. 2006;176:1878–1888.
47. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends immunol*. 2007;28:429–436.
48. Sakat, S., A.R. Juvekar, M.N. Gambhire.(2010).In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of Oxalis corniculata Linn.Int J Pharm PharmacolSci:2(1);146-55.
49. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:469–478.
50. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005;6:1191–1197.
51. Sharma, S., & Agarwal, N. (2011). Nourishing and healing prowess of garden cress (*Lepidium sativum* Linn.)-A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(3), 292–297.
52. Shendkar, A.K., Chaudhari, S.G., Shendkar, Y.K. (2014) .In vitro antiarthritic activity of With aniacocoagul ansdunal fruits. *IAJPR*:4;915-924.
53. Splettstoesser WD & Schuff-Werner P. Oxidative stress in phagocytes—the enemy within. *Microscopy Research and Technique* 2002; 57: 441–455.
54. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140:805–820.
55. Vallance P & Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart (British Cardiac Society)* 2001; 85: 342–350
56. Van Oudtshoorn and Van Rooyen, 2013 K.V.R. Van Oudtshoorn, M.W. Van Rooyen *Dispersal Biology of Desert Plants Springer Science & Business Media* (2013)
57. Wadhwa et al., 2013 J. Wadhwa, A. Nair, R. Kumria Potential of plant mucilages in pharmaceuticals and therapy *Curr. Drug Deliv.*, 10 (2013), pp. 198-207
58. Wadhwa, S., Panwar, M. S., Agrawal, A., Saini, N., & Patidar, L. P. L. (2012). A Review on pharmacognostical study of lepidium sativum lepidium sativum. *ARPB*, 2(4), 316323.
59. Wadhwa, s., panwar, m. S., agrawal, a., saini, n., patidar, l.n. (2012) a review on pharmacognostical study of lepidium sativum. *Advance research in pharmaceuticals and biologicals*, 2 (4): 316-323.

60. Williams L., Hibbert S., Porter R., Bailey-Shaw Y., Green C. Jamaican plants with in vitro antioxidant activity. Research Signpost. In Biologically active natural products for the 21st Century. LAD Williams (ed.) 2006, pp.1-12.
61. Winters e.a. risley et g.w. nuss (2003). Carragenin-induced oedema in hindpaw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 544-547.
62. Yamamoto M, Takeda K. Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Gastroenterol Res Pract.* 2010
63. Yoon, J., Baek, S.J., 2005. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Medical Journal* 46, 585–596.
64. Zhou Y, Hong Y, Huang H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Kidney and Blood Pressure Res.* 2016;41:901–910.

## ANNEXES

### ❖ **Solution d'Alsever**

1. 2 % de dextrose
2. 0.8 % de citrate de sodium
3. 0.05 % d'acide citrique
4. 0.42 % de chlorure de sodium

### ❖ **Solution du Tampon phosphate saline**

1. 1000 ml d'eau distillée
2. 8 g NaCl
3. 0.2 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>
4. 0.24 g KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>
5. pH à 7.4.