

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA de Bejaia
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie Physico-chimique



Mémoire

Présenté par :

M^{elle} AIT-IDIR Narimane

M^{elle} BOUYOUCHEF Hanane

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Biologie

Option : Génétique Appliquée

Thème :

**Etude de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits
des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L.
sur la stabilité membranaire du globule rouge**

Membres de jury :

Grade :

Président : Mr Hamoum M.

M.A.A

Examineur : Mr Tacherfiout M.

M.A.A

Promoteur : Mme Rahmani-Berboucha M.

M.A.A

Promotion 2016 /2017

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce modeste travail.

*Nos remerciements s'adressent en particulier à notre promotrice **M^{me} Rahmani Meriem**, qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordée, nous a permis de réaliser ce travail.*

*Nous remercions l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, notamment : **Mr Hamoum M.** (Président) et **Mr Tacherfiout M.** (Examinateur).*

*Nous tenons à remercier **D^r Atmani Dina**, responsable de laboratoire Génétique de l'université de Bejaïa, ainsi que toute l'équipe du laboratoire (**Naima, Malika, Farah et Asma**).*

*Nos vifs remerciements s'adressent tout particulièrement au laboratoire d'analyses médicales du **D^r Moulak**, et spécialement **Daouia**.*

*Nos plus sincères remerciements au **D^r Ramdani Nacer**, pour sa présence, son aide, sa gentillesse au quotidien et son soutien dans les moments difficiles.*

*Un grand merci pour toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, essentiellement **Nacer et Youcef**, merci infiniment.*

Narimane - Hanane

Dédicaces

A la mémoire de mes grands-mères et mes grands-pères.

Je dédie ce mémoire

A mes parents,

*La source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'ont pas cessé de
m'encourager et de prier pour moi.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous
méritez pour tous l'amour et les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner
depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

Que Dieu vous protège et vous garde pour moi.

*A mon très cher frère **Hakim** et mes chères sœurs **Salma** et **Razika***

Je dédie ce travail aussi,

A mes tantes et oncles,

A mes cousins et cousines.

*A mon binôme **Narimane** et mes aimables amies **Melissa**, **Fatima**, **MERJEM**,*

***Manel**, **Taous**, **Souad** et **Rym**.*

*A **Youcef**, qui m'a toujours aidé et encouragé, qui était toujours à mes côtés*

Merci infiniment.

Hanane

Dédicaces

*Avec un énorme plaisir et une immense joie, que je dédie ce travail à mes chères
parentes, pour leurs sacrifices et leurs soutiens permanents*

pendant mes années d'études,

*A toute ma famille, mon frère, mes sœurs, mes beaux-frères, ma belle famille mes
chers neveux et nièces*

Je dédie aussi ce mémoire à tous mes amis (Hanane, Souad, Meriem et Rym)

*Je ne saurai terminer sans citer ma promotrice **M^{me} Rahmani***

*Enfin à toute personne qui m'ont encouragée ou aidée toute au long de
mes études.*

Narimane

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet

Ac : Absorbance du control

ADN : Acide disoxyribonucléique

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens

ANOVA : Analyse de la variéance

AP-1 : Protéine activatrice-1

At : Absorbance du test

ATP : Adénosine triphosphate

C^- : Control négatif

C^+ : Control positif

Ca^{2+} : Calcium

C-H : Liaison carbone-hydrogène

COX : Cyclooxygénase

ERO : Espèces réactives oxygénées

Fe^{2+} : Fer

Fe^{3+} : Oxyde ferrique

GC : Glucocorticoïdes

GRE : Glucorticoid Response Element

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

HLA : Human leukocyte antigen

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

IFN : Interferon

IL : Interleukine

iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible

K^+ : Potassium

LOX : Lipooxygénase

MAP kinase : Mitogen-activated protein kinase

MMPs : Métalloprotéases

Na⁺ : Sodium

Na₂HPO₄ 2H₂O : di-Sodium Hydrogénophosphate

NaCl : Chlorure de sodium

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NaH₂PO₄ 2H₂O : Sodium dihydrogénophosphate

NaOH : Hydroxyde de sodium

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

NO : Monoxyde d'azote

O₂⁻ : Anion superoxyde

OH[•] : Radical hydroxyle

PBS : Phosphat buffered saline

rpm : Tour par minute

SEM : Standard error of mean

SOD : Superoxyde dismutase

STAT-1 : Signal transducer and activator of transcription 1

TGF : Transforming growth factor (facteur de croissance transformant)

TNF : Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose tumorale)

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

Liste des figures

- Figure 01 : Photographie des feuilles et écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. 15
- Figure 02 : Effet de l'acide gallique sur l'hémolyse des globules rouges en fonction des concentrations..... 19
- Figure 03 : Effet des extraits éthanolique des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. sur l'hémolyse des globules rouges en fonction des concentrations 20
- Figure 04 : Effet de l'acide gallique et du diclofenac sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations..... 21
- Figure 05 : Effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations..... 22
- Figure 06 : Effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations..... 23
- Figure 07 : Effet de l'extrait éthanolique des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations 24
- Figure 08 : Effet de l'extrait éthanolique des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations. Cet effet est comparé à celui de l'acide gallique et diclofenac25

Liste des tableaux

Tableau I : Effets des principaux médiateurs impliqués dans le processus inflammatoires.	5
Tableau II : Plantes à activité anti-inflammatoires.....	8
Tableau III : Utilisation thérapeutique traditionnelle de <i>Pistacia lentiscus</i>	9
Tableau IV : Quelques composants chimiques des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i>	10
Tableau V : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vivo</i>	11
Tableau VI : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i>	12

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction 1

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

I.1. Inflammation 2

I.1.1. Inflammation aiguë 2

I.1.1.1. Phase vasculaire 2

I.1.1.2. Phase cellulaire 3

I.1.1.3. Phase de résolution 4

I.1.2. Inflammation chronique 4

I.2. Médiateurs de l'inflammation 4

I.3. Anti-inflammatoires 6

I.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) 6

I.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes) 7

I.3.3. Anti-inflammatoires naturels 7

I.4. Pistacia lentiscus L. 8

I.4.1. Etude botanique.....	8
I.4.2. Utilisation thérapeutique traditionnelle de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	8
I.4.3. Etude chimique de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	9
I.4.4. Activités pharmacologiques de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	10
I.5. Méthodes utilisées dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire	11
I.6.1. Choix des globules rouges comme modèle pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i> , des extraits éthanolique des feuilles et d'écorces de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	12
I.6.2. Composition et hémolyse du sang	12
I.6.3. Stress oxydant et globules rouges	13

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel.....	15
II.1.1. Matériel divers.....	15
II.1.2. Produits chimiques	15
II.1.3. Extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ..	15
II.1.4. Echantillons de sang humain	16
II.2. Méthodes	16
II.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i> , des extraits des feuilles et des écorces des racines de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	16
II.2.1.1. Préparation de la suspension des globules rouges humains	16

II.2.1.2. Evaluation de la toxicité des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> L. vis-à-vis des globules rouges	16
II.2.1.3. Evaluation de l'effet des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> L. sur la stabilisation de la membrane des globules rouges	17
II.2.2. Traitement statistique.....	18

CHAPITRE III : Résultats et discussion

III.1. Evaluation de la toxicité des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de <i>Pistacia lentiscus</i> L. vis-à-vis des globules rouges	19
III.2. Evaluation de l'effet des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de <i>Pistacia lentiscus</i> L. sur la stabilisation de la membrane des globules rouges.....	20
Conclusion.....	32
Références bibliographiques	33

La réponse inflammatoire 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, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalies quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (**Weill et al., 2003 ; Medzhitov, 2010**).

D'un autre côté, la surproduction des espèces réactives d'oxygènes, au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques conduit au stress oxydant, qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies inflammatoires, neurodégénératives, cardiovasculaires et cancer (**Auddy et al., 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens (diclofenac). Ces molécules, bien qu'étant efficaces, présentent le plus souvent des effets indésirables, qui peuvent gêner leur utilisation au long cours (**Jick, 1994 ; Henzen, 2003 ; Risser et al., 2009**), alors que l'utilisation de composés phytochimiques s'avère utile et sans effets secondaires (**Barnes, 1998**).

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de *Pistacia lentiscus* L. (connu en Algérie sous le nom de Darou et Amadagh en kabyle) ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques, afin de caractériser ses constituants responsables éventuellement de leurs propriétés pharmacologiques (**Romani et al., 2002**). La richesse des différentes parties de *Pistacia lentiscus* L. en polyphénols et en flavonoïdes lui confère plusieurs activités biologiques (**Manthey, 2000 ; Bozorgi et al., 2013**).

L'objectif de la présente étude est l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L., via le test de stabilisation de la membrane des érythrocytes.

Pour ce faire, un test de cytotoxicité a été réalisé dans un premier temps, afin de cibler les concentrations à utiliser.

L'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. a été évaluée, dans un deuxième temps, par le test de stabilisation des membranes des globules rouges, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique associée à une température élevée.

I.1. Inflammation

L'inflammation est un processus de défense immunitaire de l'organisme en réponse à une agression d'origine exogène (brûlure, infection, allergie, traumatisme) ou endogène (cellules cancéreuses ou pathologies auto-immunes), dont le but d'éliminer l'agent pathogène, réparer les lésions tissulaires et favoriser le retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé (**Ryan et Majno, 1977 ; Iwalewa *et al.*, 2007 ; Barton, 2008**). Les signes cliniques de ce processus sont : chaleur, rougeur, gonflement et douleur, de plus, une altération du fonctionnement de l'organe touché peut survenir. Au niveau tissulaire, la réponse inflammatoire se caractérise par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'augmentation de la dénaturation de protéines et l'altération de membranes cellulaires (**Scott *et al.*, 2004 ; V Stankov, 2012**). Cette réponse, dénommée inflammation aiguë, est un phénomène bénéfique pour l'organisme. Ainsi, non contrôlée, l'inflammation persistante devient défavorable et peut être un facteur étiologique de diverses maladies chroniques comme l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le cancer et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Weill *et al.*, 2003 ; Medzhitov, 2010**).

I.1.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, elle dure de quelques jours à quelques semaines et peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate ; une phase cellulaire consécutive et une phase de résolution et de cicatrisation (**Weill *et al.*, 2003 ; Charles *et al.*, 2010**).

I.1.1.1. Phase vasculaire

Cette étape nécessite l'activation des cellules endothéliales et l'expression à leur surface de molécules d'adhésion (sélectine E, P, ICAM-1, VCAM-1). Ces dernières, servant de récepteurs pour des molécules d'adhésion complémentaires exprimées à la surface des leucocytes circulants, vont permettre l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire, ce qui entraîne une vasoconstriction artériolaire (**Henrotin *et al.*, 2001 ; Charles *et al.*, 2010**). L'adhésion des leucocytes est induite et amplifiée par une série de facteurs produits par les cellules endothéliales activées, notamment l'IL-1 β et le TNF- α , qui, par leur action vasodilatatrice, réduisent le débit sanguin, ce qui favorise le roulement des leucocytes sur l'endothélium (**Henrotin *et al.*, 2001**). Suite à cette vasoconstriction, une vasodilatation des vaisseaux sanguins va permettre l'afflux massif de sang vers le foyer inflammatoire.

L'augmentation de la perméabilité des capillaires permet aux cellules sanguines de s'extravaser, ce qui explique les signes de la chaleur et de la rougeur (**Henrotin et al., 2001 ; V Stankov, 2012**). Une fois fixés à l'endothélium vasculaire, les polymorphonucléaires neutrophiles et les monocytes franchissent la barrière endothéliale au niveau des jonctions intercellulaires vers le site de l'inflammation (diapédèse), cela s'accompagne d'un transfert de plasma qui crée l'œdème (**Henrotin et al., 2001 ; Iwalewa et al., 2007**). Cette phase vasculaire est déclenchée par l'action de médiateurs chimiques, caractérisée par la douleur et expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine, de prostaglandine et de kinine (**Medzhitov, 2010**).

I.1.1.2. Phase cellulaire

Suite à la diapédèse, les leucocytes poursuivent leur progression jusqu'au site inflammatoire, attirés par un gradient de concentration de peptides chimiotactiques, formé au sein du tissu enflammé (**Henrotin et al., 2001**). Une fois parvenues au site de l'inflammation, les cellules phagocytaires sont activées et participent à la détersion en phagocytant l'agent agresseur ou les fragments du tissu altéré (**Henrotin et al., 2001 ; Charles et al., 2010**). Les polymorphonucléaires neutrophiles activés contiennent des lysozymes incluant les enzymes bactéricides et les protéases comme la β -glucuronidase (**Chou, 1997**). Ces enzymes, hydrolytiques, sont déversés dans des vacuoles de phagocytose, les lysosomes, et interviennent dans la digestion des produits de phagocytose et la dégradation des protéoglycanes de la paroi bactérienne (**Hold et El-Omar, 2008 ; Mayol et al., 2013**). Cela induit la dégranulation des composants internes de la cellule, ce qui conduit à la libération de molécules pro-inflammatoires et des facteurs cytotoxiques dans les organes cibles, participant ainsi à la détersion du pathogène (**Henrotin et al., 2001 ; Marsolais et Frenette, 2005 ; Asehnoune et Edouard, 2006**). Ces facteurs et les enzymes lysosomiales, lorsqu'elles sont libérées dans le milieu extracellulaire, peuvent entraîner des dommages cellulaires et des lyses tissulaires, ainsi que l'apoptose des cellules propres au tissu lésé, en l'absence de processus infectieux (**Chou, 1997 ; Marsolais et Frenette, 2005 ; Asehnoune et Edouard, 2006**). Les neutrophiles seront suivis par les monocytes, qui infiltreront la lésion pour s'y différencier en macrophages et exercer leurs activités phagocytaires et cytotoxiques (**Marsolais et Frenette, 2005**). La digestion du matériel phagocyté est souvent incomplète et des peptides sont apprêtés dans les phagosomes et les phagolysosomes pour être ultérieurement présentés aux lymphocytes T par des molécules HLA de classe II exprimés à la surface de la cellule,

permettant ainsi le développement de la réaction immunitaire adaptative (Weissman, 1966 ; Charles *et al.*, 2010).

I.1.1.3. Phase de résolution

Il s'agit de l'arrêt du processus inflammatoire lorsque les microorganismes pathogènes et les produits de dégradation, ainsi que les débris cellulaires sont éliminés par les éléments sécrétés par les macrophages. Cela permet la cicatrisation et la régénération tissulaire (Weill *et al.*, 2003 ; Medzhitov, 2010).

I.1.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation prolongée, définie par la présence de cellules immunitaires. Elle peut durer plusieurs semaines voire plusieurs années (Iwalewa *et al.*, 2007 ; Charles *et al.*, 2010). Dans l'inflammation chronique, les phénomènes d'inflammation, de destruction tissulaire et de réparation coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation, à la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë. Les tissus ne se régénèrent pas correctement et un phénomène de cicatrisation pathologique s'installe (Weill *et al.*, 2003).

I.2. Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire est initiée et contrôlée par de nombreux médiateurs chimiques, pro ou anti-inflammatoires, qui peuvent être des substances protéiques plasmatiques, présentes dans le sang circulant, ou proviennent de cellules telles que les mastocytes, les thrombocytes, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (Henrotin *et al.*, 2001 ; Iwalewa *et al.*, 2007). Les rôles de ces médiateurs sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : Effets des principaux médiateurs impliqués dans le processus inflammatoires.

Médiateurs de l'inflammation	Rôles dans le processus inflammatoire	Références
Histamine	Augmente la perméabilité vasculaire, permet la contraction des muscles lisses, provoque la sensation de douleur.	Ryan et Majno, 1977 ; Mayol <i>et al.</i>, 2013.
TNF- α et IL-1 β	Stimulent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales favorisant ainsi la migration des leucocytes vers le site enflammé, stimulent la libération des chimiokines, stimulent l'activation de la phospholipase A2, activent la production intracellulaire d'espèces réactives d'oxygène, stimulent l'expression des MMPs	Levy et Kelly, 1993 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006.
IL-6	Induit localement l'activation des phagocytes, favorise le recrutement des monocytes sanguins vers les tissus enflammés, induit la production de protéine de la phase aigue (protéine C-réactive)	Ostrowski <i>et al.</i>, 1999 ; Mayol <i>et al.</i>, 2013.
IL-8	Possède des propriétés chimioattractantes pour les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, favorisant leur diapédèse, induit la libération d'enzymes lysosomiales, d'oxydant et de médiateurs lipidiques	Henrotin <i>et al.</i>, 2001 ; Mayol <i>et al.</i>, 2013.
Prostaglandines	Inhibent la synthèse de cytokines activatrices des lymphocytes, puissants vasodilatateurs, participent à la formation de l'œdème et sont responsables de la douleur	Henrotin <i>et al.</i>, 2001 ; Iwalewa <i>et al.</i>, 2007.
Leucotriènes	Augmentent la perméabilité vasculaire, participent à la formation de l'œdème, possèdent des propriétés chimiotactiques, stimule la production de l'IL-2, de l'IFN- γ et de l'IL-4 par les lymphocytes T	Henrotin <i>et al.</i>, 2001.
Substance P	Stimule la prolifération des lymphocytes et la production d'immunoglobulines, favorise la sécrétion des cytokines de l'inflammation, libération des radicaux oxygénés, les dérivés de l'acide arachidonique et de l'histamine, stimule le chimiotactisme	Henrotin <i>et al.</i>, 2001 ; O'Connor <i>et al.</i>, 2004.
Métalloprotéases	Modifient la matrice extracellulaire en dégradant ses composants, facilitent la migration des cellules immunitaires vers le site inflammatoire	Manicone et McGuire, 2008 ; Mayol <i>et al.</i>, 2013.
IL-4, IL-10 et IL-12	Inhibent la libération de TNF- α et d'IL-1 β , réduisent le nombre des polymorphonucléaires dans le tissu enflammé, stimulent la libération du TGF- β 1	Marsolais et Frenette, 2005; Charles, 2010.

D'une autre part l'inflammation est considérée comme une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées, au cours de la phagocytose. Ces cellules, dont les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages, possèdent des granules à protéases qui dégradent le matériel phagocyté, mais qui vont produire beaucoup d'espèces oxygénées, via le système NADPH-oxydase, enzyme membranaire capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes (O_2^-) qui, rapidement se transforme par dismutation en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier peut diffuser dans le milieu extracellulaire, où il est impliqué dans une cascade de réactions chimiques conduisant à la formation d'autres espèces oxygénées très oxydantes, l'oxygène singulet (1O_2) et le radical hydroxyle (OH^\cdot) (**Henrotin et al., 2001 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Barton, 2008**). L'inflammation accélère la production d'espèces oxygénées et diminue la capacité de défense antioxydante, favorisant l'apparition d'un stress oxydant, un facteur important dans le développement des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et cancer (**Auddy et al., 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Ainsi, le stress oxydant peut produire ou entretenir un processus inflammatoire, il inactive les antiprotéases, et à l'inverse active les métalloprotéases, favorisant une protéolyse et destruction cellulaire non contrôlée. De plus, l'activation du facteur de transcription NF- κ B stimule la transcription des facteurs pro-inflammatoires, à l'origine de la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

I.3. Anti-inflammatoires

I.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments aux propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Plusieurs classifications sont proposées, fondées soit sur la structure des AINS, la puissance, les modalités d'action et/ou la sélectivité anti-COX (**Cuvillon et Viel, 2002**). En effet, les AINS agissent tous en inhibant les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), diminuant ainsi la synthèse des prostaglandines E2 et du thromboxane A2 (**Risser et al., 2009**).

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, en inhibant la synthèse de prostaglandines qui ont un rôle dans l'agrégation plaquettaire et la protection de l'estomac, sont responsables des événements défavorables, en gênant ainsi l'agrégation plaquettaire et donc la coagulation

du sang, ce qui peut prévenir la formation des caillots (thrombose), mais aggrave les hémorragies; en provoquant aussi des problèmes gastro-intestinaux (ulcères), rénaux et d'hypersensibilité (Jick, 1994 ; Risser *et al.*, 2009).

I.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Les glucocorticoïdes (GC) traversent librement les membranes cellulaires, se fixent sur des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et migrent vers le noyau et agissent directement sur l'ADN en se fixant sur des séquences spécifiques, dites GRE (Glucocorticoid Response Element). Ce complexe intervient dans la régulation de la transcription des gènes cibles en réduisant la perméabilité capillaire, la production de facteurs chimiotactiques, la phagocytose, bloquant ainsi la libération de sérotonine, d'histamine et de bradykinines. De plus, les GC peuvent augmenter la transcription des gènes anti-inflammatoires et inhiber l'action de certaines protéines nucléaires transactivatrices, dont le NF- κ B et la protéine activatrice-1 (AP-1), inhibant ainsi l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-2, TNF- α); récepteurs et molécules d'adhésion et la production de la phospholipase A2 (Barnes, 1998 ; Rhen et Cidlowski, 2005).

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie. Divers troubles peuvent être observés tels que, l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, ainsi que des troubles digestifs (apparition d'ulcères gastro-duodénaux), musculosquelettiques (ostéoporose) et endocriniens (prise de poids) (Henzen, 2003).

I.3.3. Anti-inflammatoires naturels

La phytothérapie est utilisée depuis toujours dans la médecine traditionnelle. Le nombre de composés phytochimiques, trouvés dans les plantes médicinales est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand (Barnes, 1998). Quelques exemples de plantes douées d'activités anti-inflammatoires sont cités dans le tableau II.

Tableau II : Plantes à activité anti-inflammatoires.

Plantes	Parties utilisées	Activités	Références
<i>Green tea</i>	Catéchine, acide gallique	Stabilisation de la membrane d'érythrocytes en inhibant la peroxydation lipidique	Ma et al., 2000.
<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook F	Racines	Anti-inflammatoire et anti-rhumatisme	Chou, 1997.
<i>Oxalis corniculata</i> Linn. (Oxalidaceae)	Plante entière	Antioxydant et anti-inflammatoire	Sakat et al., 2010.
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Apiacées)	Graines	Antioxydant	Athamena et al., 2010.
<i>Cedrus deodara</i> (Pinacea)	Huile essentielle	Anti-inflammatoire et anti-rhumatisme	Shinde et al., 1999.
<i>Plumbago zeylanica</i> (Plumbaginaeaceae)	Racines	Ulcères, fièvre, antioxydant et anti-inflammatoire	Raimi et Oyedapo, 2009.

II. *Pistacia lentiscus* L.

II.1. Etude botanique

Le lentisque (*Pistacia lentiscus* L.), Darou en arabe local et Amadagh en kabyle, est un arbrisseau de la famille des Anacardiaceae, qui comprend environ 70 genres et plus de 600 espèces, distribué du bassin méditerranéen à l'Asie centrale (**Charef et al., 2008 ; Lahsissene et al., 2009 ; Bozorgi et al., 2013**). Cette espèce peut atteindre la hauteur de 3m, son écorce est brune ou rougeâtre, ses rameaux sont nombreux et étendus, ses feuilles persistantes disposées par paires, les fleurs sont de petites taille (2 à 3 mm de large) paniculées et rougeâtres et ses fruits en grappes de couleur rouge puis noirâtre à maturité (**Chrétien, 1993**).

II.2. Utilisation thérapeutique traditionnelle de *Pistacia lentiscus* L.

Pistacia lentiscus a une longue tradition dans la médecine populaire datant des temps des grecs anciens, plusieurs utilisations thérapeutiques ont été rapportées sur cette espèce (Tableau III).

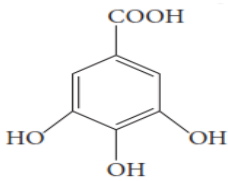
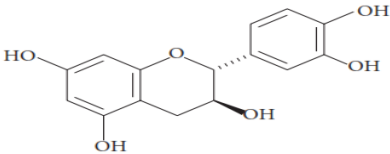
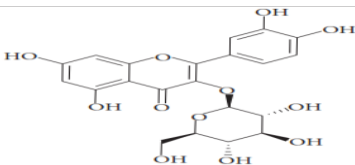
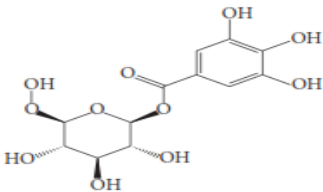
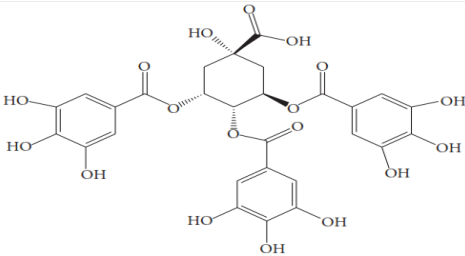
Tableau III : Utilisation thérapeutique traditionnelle de *Pistacia lentiscus*.

Partie utilisée de la plante	Utilisation thérapeutique traditionnelle	Références
Feuilles	Infection de la gorge, eczémas, herpès, douleurs abdominale et intestinale, jaunisse et rhumatisme	Bozorgi et al., 2013.
Fruits	Grippe, rhumatisme, eczéma, diarrhée et infections de gorge	Bozorgi et al., 2013.
Ecorces	Douleur intestinale, diabète et diarrhée	Lahsissene et al., 2009.
Résine	Ulcère de l'estomac, troubles intestinaux, diabète et douleurs abdominales	Lev et al., 2000 ; Lev et al., 2002.

II.3. Etude chimique de *Pistacia lentiscus* L.

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de *Pistacia lentiscus* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques afin d'identifier leurs principes actifs. En effet, la composition chimique des feuilles de *Pistacia lentiscus* est caractérisée par la présence de plusieurs types de flavonoïdes, comme la quercétine glycosilé, la myricétine glycosilé, la luteoline, la catéchine ainsi que l'isoflavone genisteine. Elles contiennent 6 à 7 % de gallotannins de faible poids moléculaire, à savoir l'acide gallique et les dérivés d'acide quinique 5-O-, 3,5-O-di- et 3,4,5-O-trigalloyl (**Romani et al., 2002**). Le tableau IV illustre les structures chimiques de certains de ces composés.

Tableau IV : Quelques composants chimiques des feuilles de *Pistacia lentiscus* (Bozorgi *et al.*, 2013).

Nom du composant chimique	Structure
Acide gallique	
Catechine	
Quercetin-3-glucoside	
Monogalloyl glucose	
3,4,5-Tri-O-galloylquinic acid	

II.4. Activités pharmacologiques de *Pistacia lentiscus*L.

Plusieurs études ont été apportées sur les propriétés pharmacologiques de *Pistacia lentiscus*, citant en titre d'exemple :

- **Activités anticancéreuses** : la gomme du mastic de *Pistacia lentiscus* contient des composés qui inhibent la prolifération et induisent l'apoptose des cellules cancéreuses (Balan *et al.*, 2007).
- **Activités antimicrobiennes et antivirales** : les composés phénoliques de *Pistacia lentiscus* sont un moyen de défense contre les micro-organismes. Le nombre de groupement hydroxyle augmente la toxicité contre les micro-organismes soit par la chélation des ions

métallique, soit par des interactions non spécifiques, telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires, afin d'inactiver l'adhésion des micro-organismes (Cowan, 1999 ; Lin *et al.*, 2005).

- **Activité Antimutagène** : les polyphénols isolés de *Pistacia lentiscus* (acide gallique, acide et digallique et 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose), ont une activité inhibitrice de la mutagénicité et la génotoxicité dans des essais, *in vitro* (Bozorgi *et al.*, 2013).

- **Activité antioxydant** : la richesse des différentes parties de *Pistacia lentiscus* en polyphénols et en flavonoïdes lui confère l'activité antioxydante et cela par le piégeage direct des ERO, l'inhibition des enzymes génératrices d'ERO, la chélation des ions de métaux de transition, responsables de la production des ERO et l'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes (Halliwell, 1994 ; Atmani *et al.*, 2009 ; Bozorgi *et al.*, 2013).

- **Activité anti-inflammatoire** : la présence de flavonoïdes dans les différentes parties de *Pistacia lentiscus* lui confère cette activité anti-inflammatoire, cela par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro-inflammatoires très actives. Cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase A2 (Manthey, 2000 ; Bozorgi *et al.*, 2013).

III. Méthodes utilisées dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes médicinales. Ces méthodes sont représentées dans les tableaux V et VI.

Tableau V : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vivo*.

Test <i>in vivo</i>	Références
Induction d'un œdème, chez des rats, par injection sous plantaire du carragénine	Vadivu et Lakshmi, 2008.
Induction d'œdème en appliquant l'huile de corton sur l'oreille de souris	Huang et al., 2011.
Provocation d'une inflammation par application d'acide arachidonique sur l'oreille de souris	Garrido <i>et al.</i> , 2004.

Tableau VI : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*.

Test <i>in vitro</i>	Références
Inhibition de l'activité des protéases	Govindappa et Poojashri, 2011.
Inhibition de la dénaturation des protéines (albumine bovine)	Karthik <i>et al.</i>, 2013.
Test de stabilisation des membranes d'érythrocytes via l'induction d'hémolyse des globules rouges par hypotonie et par chaleur	Sakat <i>et al.</i>, 2010 ; Chippada <i>et al.</i>, 2011.

III.1. Choix des globules rouges comme modèle pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits éthanolique des feuilles et d'écorces de *Pistacia lentiscus* L.

Les globules rouges sont choisis comme modèle pour le test de stabilisation membranaire grâce à leur membrane qui est analogue à la membrane lysosomale. La stabilisation de la membrane érythrocytaire implique la stabilisation de la membrane lysosomale qui est importante dans la limitation de la réponse inflammatoire en empêchant la sortie des enzymes lysosomale (**Vadivu et Lakshmi, 2008**). Le rôle de ces enzymes est de dégrader les protéines, les acides nucléiques, les oligosaccharides et les phospholipides. La membrane lysosomale sépare les enzymes hydrolytiques du cytosol et héberge des protéines de transport qui transloquent les produits dégradés du lysosome vers le cytosol (**Coujard *et al.*, 1980 ; Abraham, 2002**). De plus, les érythrocytes ne contiennent pas des organites et possèdent seulement une membrane plasmique, qui est riche en acides gras polyinsaturés et susceptible aux radicaux libres, ce qui facilite l'étude des interactions entre oxydant et antioxydant et entre médicament et biomembrane (**Chen et Huestis, 1997 ; Reddy *et al.*, 2007**).

III.2. Composition et hémolyse du sang

Le sang est un tissu conjonctif fluide, de couleur rouge, légèrement visqueux, d'aspect homogène avec une odeur fade et une saveur saline. Il est légèrement alcalin, son pH varie entre 7,34 et 7,45 et circule dans l'organisme par un réseau d'artères partant du cœur, pour assurer le transport de l'oxygène et des nutriments. Une goutte de sang frais contient 55% de plasma et 45% de cellules sanguines. Ces dernières regroupent les leucocytes (globules

blancs), les plaquettes (thrombocytes) et les érythrocytes (globules rouges) (**Gautier, 1874 ; weill et al., 2003**).

Les globules rouges sont des disques biconcaves produits dans la moelle osseuse au cours d'un processus appelé l'hématopoïèse. Leur diamètre est de 7 à 8µm. La fonction primaire d'un érythrocyte est d'assurer le transport de l'oxygène et le dioxyde de carbone (**weill et al., 2003**). La membrane du globule rouge est un ensemble complexe de 40% de lipides, 52% de protéines et 8% de glucides. Les lipides forment une bicouche continue de 4 à 5 nm d'épaisseur composée de 95% de phospholipides et de cholestérol, interagissant avec un réseau complexe de protéines et de glucides (glycolipides ou glycoprotéines), le cytosquelette membranaire est tout un ensemble de protéines et glucides externes qui se projettent au-delà de la surface cellulaire (**Chiaroni et al., 2011**). La membrane plasmique des érythrocyte, qui enveloppe la molécule d'hémoglobine, s'use à force de traverser les capillaires et sa rupture provoque l'éclatement de la cellule, ce phénomène est appelé l'hémolyse (*haima* = sang ; *lysis* = destruction), causé par l'entrée des molécules d'eau dans les cellules par osmose plus rapidement qu'elles n'en sortent (**weill et al., 2003 ; Dubé et Matin, 2016**).

III.3. Stress oxydant et globules rouges

Dans la circulation, les globules rouges sont continuellement exposés aux sources endogènes et exogènes d'espèces réactives oxygénées (ERO), qui peut endommager la membrane des érythrocytes et détériorer leur fonction. Pour minimiser l'effet de ces ERO et le stress oxydatif, les globules rouges sont dotés d'un système antioxydant non enzymatique comme le glutathion et enzymatique tels que la superoxyde dismutase (SOD), la peroxiredoxine-2, le glutathion peroxidase et la catalase (**Mohanty et al., 2014**).

Les radicaux libres et le stress oxydant peuvent modifier les propriétés chimiques et physiques des membranes cellulaires des érythrocytes en modifiant la composition, la protection et la distribution de leurs lipides. Ceci aboutit à une altération structurale de la membrane cellulaire du globule rouge, ce qui se manifeste par une réduction de sa fluidité, qui peuvent modifier l'activité des protéines membranaires, augmentant ainsi sa rigidité (**Portier et al., 2007**). Les érythrocytes sont particulièrement vulnérables, car ces cellules anucléées ne possèdent pas la capacité de réparer leur membrane ni de se régénérer. Cependant, en comparaison aux autres cellules, l'érythrocyte présente de grandes activités d'enzymes

antioxydantes les plus importantes. De plus, la plupart de la capacité antioxydante non enzymatique du sang y est localisée. Les globules rouges se comportent comme des pièges à radicaux libres circulants et protègent ainsi les autres tissus et organes (**Portier et al., 2007**). L'oxydation par la NADPH oxydase est considérée comme la source interne majeure du superoxyde (O_2^-) qui est converti en l'eau oxygénée, moins toxique (H_2O_2), par l'action de l'enzyme antioxydante, superoxyde dismutase. Par la suite le H_2O_2 produit le radical hydroxyle toxique (OH^-) via la réaction de Fenton menant ainsi à la diminution de la rigidité cellulaire des globules rouges (**Bhattacharjee et al., 2016**). De plus, la catalase peut réagir rapidement avec l'eau oxygénée (H_2O_2) supplémentaire dans les globules rouges et le convertir en oxygène, selon la réaction suivante : $H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + \frac{1}{2} O_2$ (**Mohanty et al., 2014**). Au cours de l'hémolyse, l'hémoglobine extracellulaire provoque l'accumulation des radicaux libres à partir du fer de l'hème par la production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (**Haber et Weiss, 1934 ; Sadrzadeh et al., 1984**).



Réaction de Fenton (**Cillard et Cillard, 2006**).

L'objectif de ce présent travail est l'évaluation de l'effet protecteur des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, via le test de stabilisation de la membrane, réalisée sur les globules rouges humains en raison de la structure commune de la membrane érythrocytaire et celle des lysosomes. Dans le but de limiter la sortie des constituants lysosomaux au cours de l'inflammation.

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel divers

Balance de précision (Sartorius, poids : max 61g), Balance analytique (RADWAG, poids : max 600g), Centrifugeuse (Sigma), Spectrophotomètre (SHIMADZU), Agitateur électromagnétique (VELP), pH mètre (HANNA), Etuve (BINDER), Micropipettes, éprouvettes, tube à essai, erlenmayer, spatules, pipettes, poires, bicher,...

II.1.2. Produits chimiques

Ethanol et méthanol, de marque Prolabo, chlorure de sodium (NaCl) et hydroxyde de sodium (NaOH) (Biochem), Diclofenac (Votrex, 100 mg), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panroac).

II.1.3. Matériel végétale et extraction des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L.

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* L. ont été échantillonnées en mois de juin 2015, dans un endroit naturel loin de toute pollution au niveau de la région de Berbacha de la ville de Bejaia, tandis que la récolte de l'écorce des racines a été faite en mois de novembre, de la même année (Figure 01).



Figure 01 : Photographie des feuilles (a) et écorces des racines (b) de *Pistacia lentiscus* L. (originale).

Les différentes parties de *Pistacia lentiscus* L. (feuilles et écorces des racines) ont été séchées dans un endroit aéré à l'abri de la lumière et à température ambiante, puis broyées et tamisées, jusqu'à obtention d'une poudre fine.

L'extraction appliquée consiste en une macération des poudres des deux parties de *Pistacia lentiscus* L. dans de l'éthanol (1:4, p/v), sous agitation, pendant 24h. Après décantation, le surnageant a été mis à évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur.

II.1.4. Echantillons de sang humain

Des échantillons de sang frais (environ 6 mL) ont été récupérés dans des tubes héparinisés, à partir du laboratoire d'analyses médicales du D^r Moualek de la région de Bejaia, où la prise de sang a été effectuée, sur des volontaires (20-45 ans) n'ayant pas pris de médicaments anti-inflammatoires, durant les deux dernières semaines avant le prélèvement.

II.2. Méthodes

II.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L.

II.2.1.1. Préparation de la suspension des globules rouges humains

Les échantillons de sang récupérés ont été centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min. Le surnageant est, par la suite, éliminé et le culot de globules rouges a été lavé trois fois avec de l'eau physiologique, jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair, en centrifugeant à chaque fois à la vitesse 3000 rpm, pendant 5 min. Le volume de globules rouges a été mesuré afin de préparer une suspension de 10 % (v/v) de globules rouges humains, avec de l'eau physiologique.

II.2.1.2. Evaluation de la toxicité des extraits de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis des globules rouges

Avant d'entreprendre le test de l'activité anti-hémolytique des extraits des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L., un test de toxicité est nécessaire, afin de cibler les concentrations à utiliser. En effet, 1.6 mL de différentes concentrations des deux extraits à tester, ainsi que l'acide gallique, pris comme molécule de référence de composés phénoliques, rapportée à forte concentrations dans les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* L., que ça soit sous sa forme libre ou liée (tannins hydrolysables) (Romani *et al.*, 2002), ont été mélangées avec 0.4 mL de la suspension de globules rouges à 10 %. Le mélange a été

incubé à 37 °C pendant 30 min, puis centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été effectuée à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, un contrôle incluant 0.4 mL de la suspension de globules rouges et 1.6 mL d'eau physiologique ou de l'eau distillé, à la place de l'extrait, a été préparé pour vérifier l'état des globules rouges ou le 100 % d'hémolyse, respectivement.

Le pourcentage d'hémolyse est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (At / Ac) * 100 \text{ (Shobana et Vidhya, 2016).}$$

At : absorbance de l'échantillon (test)

Ac : absorbance de control (100 % d'hémolyse)

II.2.1.3. Evaluation de l'effet des extraits de *Pistacia lentiscus* L. sur la stabilisation de la membrane des globules rouges

Le test se base sur l'effet des extraits de la plante étudiée sur la stabilisation des érythrocytes, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique associée à une température élevée, selon le protocole de (Ganesh Gadamsetty *et al.*, 2013).

Dans des tubes à hémolyse, 0.5 mL d'extraits éthanolique de feuilles ou d'écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L, 1.5 mL du tampon phosphate (0.15 M, pH 7.4) et 2 mL de la solution hyposaline (NaCl à 0.36 %) ont été mélangés et incubés, à 37 °C pendant 20 min. Par la suite, un volume de 0.5 mL de la suspension des érythrocytes (10 %) a été rajouté pour chaque tube, enchainé d'une incubation, à 56 °C pendant 30 min. Les tubes ont été mis dans de l'eau froide pendant 20 min, afin d'arrêter la réaction ensuite centrifugé, à 3000 rpm pendant 5 min. La lecture d'absorbance du surnageant est faite à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre, Le contrôle consiste en un mélange de 2 mL de la solution hyposaline, 2 mL du tampon PBS, 0.5 mL de la suspension de globules rouges et 0.5 mL d'eau physiologique.

Le diclofenac est utilisé comme molécule de traitement anti-inflammatoire, avec les mêmes concentrations que l'extrait.

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé selon l'équation suivante :

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

Ac : absorbance de control

At : absorbance de l'échantillon (test)

II.2.2. Traitement statistique

Tous les résultats sont exprimés comme une moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.) de 4 échantillons de sang de volontaires différents. L'analyse statistique a été effectuée, en utilisant le logiciel GraphPadPrism 5.03, par l'analyse de la variance (ANOVA) suivi du test de Dunnett et tukey. Les valeurs de $P < 0.05$ sont considérées significatives.

III.1. Evaluation de la toxicité des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis des globules rouges

Les résultats du test de cytotoxicité présentant l'évolution des pourcentages d'hémolyse des globules rouges, en fonction des concentrations de l'acide gallique et des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, sont illustrés dans les figures 02 et 03.

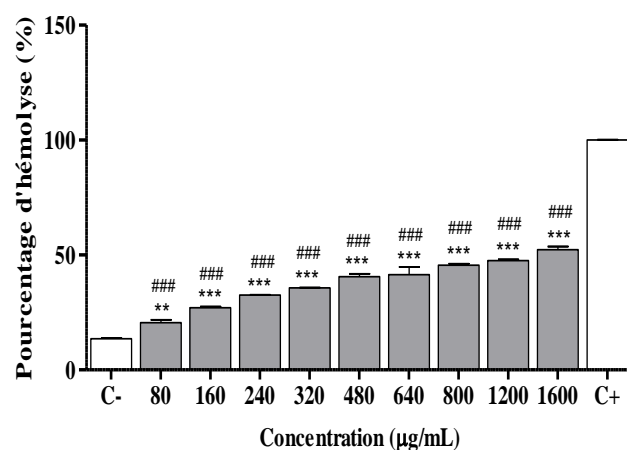


Figure 02 : Effet de l'acide gallique sur l'hémolyse des globules rouges en fonction des concentrations. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.001 comparé au contrôle négatif (préparé avec de l'eau physiologique) et #p<0,001 comparé au contrôle positif (préparé avec de l'eau distillée, présente le taux d'hémolyse à 100%). One-way ANOVA, suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

Ces résultats révèlent que le traitement des globules rouges par l'acide gallique provoque une augmentation significative du taux d'hémolyse, en fonction des concentrations. Cette molécule de référence présente un effet hémolytique significatif à partir de 80 µg/mL avec un pourcentage d'hémolyse de 20,53 %. L'effet hémolytique maximum est aux alentours de 50 %, qui reste inférieur comparativement à l'hémolyse totale, induite par l'eau distillée.

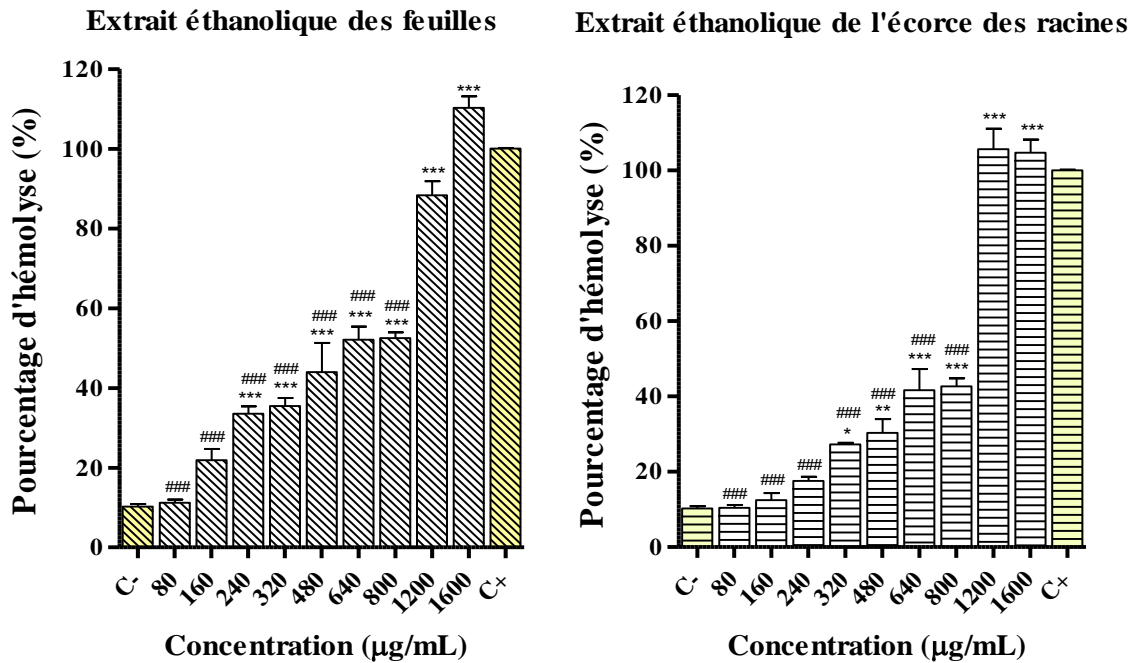


Figure 03 : Effet des extraits éthanologiques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. sur l'hémolyse des globules rouges en fonction des concentrations. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.001 comparé au contrôle négatif (préparé avec de l'eau physiologique). #p<0,001 comparé au contrôle positif (préparé avec de l'eau distillée, présente le taux d'hémolyse à 100%). One-way ANOVA, suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

De même, les taux d'hémolyse causés par les extraits éthanologiques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* augmentent significativement avec l'augmentation des concentrations. En effet, l'extrait des feuilles exhibe un taux d'hémolyse considérable (33,53 %) à partir de 240 µg/mL. Tandis que le pourcentage d'hémolyse de l'extrait éthanologique des écorces des racines augmente significativement, à partir de 320 µg/mL avec 27.25 %, pour atteindre l'hémolyse maximale (105.64 %) à 1200 µg/mL.

III.2. Evaluation de l'effet des extraits éthanologiques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. sur la stabilisation de la membrane des globules rouges

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits éthanologiques des feuilles et d'écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, un test de stabilisation membranaire de globules rouges humains a été réalisé. Ce test consiste à incuber une suspension de globules rouges humains, traitée avec une solution hypotonique associée à une température élevée, avec les extraits ou les molécules de références (le diclofenac comme anti-inflammatoire et l'acide gallique, comme molécule de composés phénoliques). Les résultats sont représentés dans la figure 04.

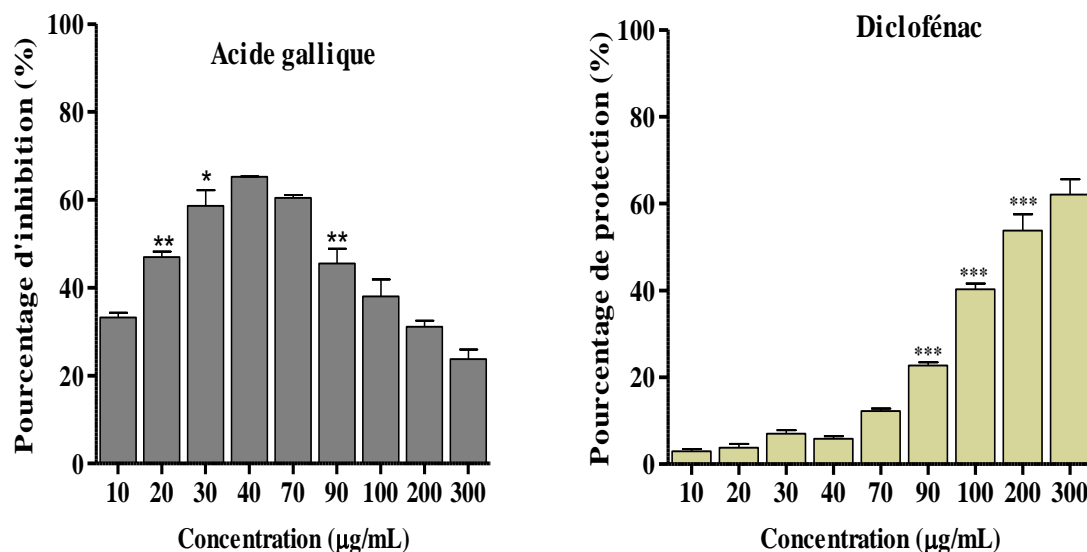


Figure 04 : Effet de l'acide gallique et du diclofenac sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 (comparaison de chaque concentration à la précédente) présente la différence significative entre les pourcentages de protection. One-way ANOVA, suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

Les érythrocytes traités avec 20, 30, 40 et 70 $\mu\text{g/mL}$ de l'acide gallique ont montré un effet anti-hémolytique significatif de 46.98, 58.65, 65.25 et 60.44 %, respectivement. A des concentrations élevées (de 90 à 300 $\mu\text{g/mL}$), l'activité anti-hémolytique diminue significativement, en comparaison avec l'effet exhibé à la concentration de 40 $\mu\text{g/mL}$.

De sa part, le diclofenac ne présente aucun effet inhibiteur significatif aux concentrations inférieures à 70 $\mu\text{g/mL}$. L'activité anti-hémolytique de ce médicament s'est révélée significatif à partir de 90 $\mu\text{g/mL}$. L'effet de diclofenac est efficace à partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ avec un pourcentage de protection de 40.28 %.

Par ailleurs, l'effet protecteur de l'extrait éthanoliques des feuilles de *Pistacia lentiscus*, contre l'hémolyse des globules rouges, provoqué par hypotonie et chaleur, est significatif à la concentration de 20 $\mu\text{g/mL}$ (39,34 %) et atteint un pourcentage maximum de 84.18 % à une concentration de 90 $\mu\text{g/mL}$, mais, l'effet de cet extrait commence à diminuer significativement à partir de 300 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 05).

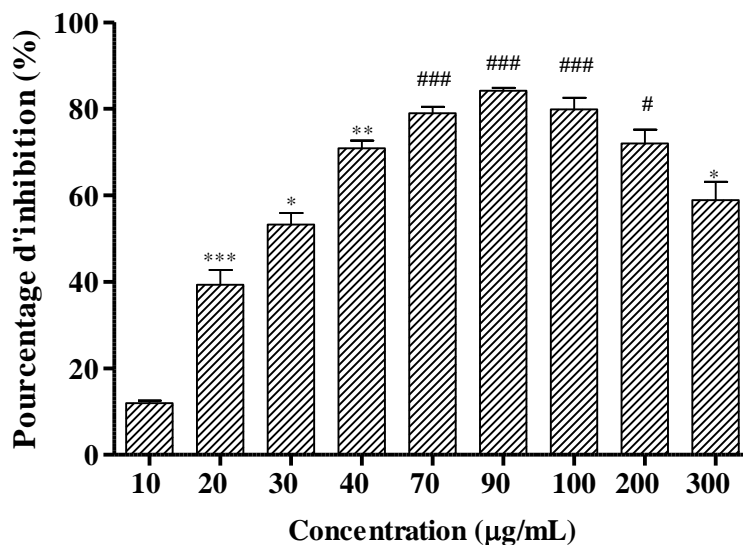


Figure 05 : Effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 (comparaison de chaque concentration à la précédente) présente la différence significative entre les pourcentages de protection. One-way ANOVA, suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

D'une autre part, une étude comparative de l'effet de l'extrait des feuilles et celui exhibé par les deux molécules de référence testées, notamment le diclofenac et l'acide gallique est illustrée dans la figure 06.

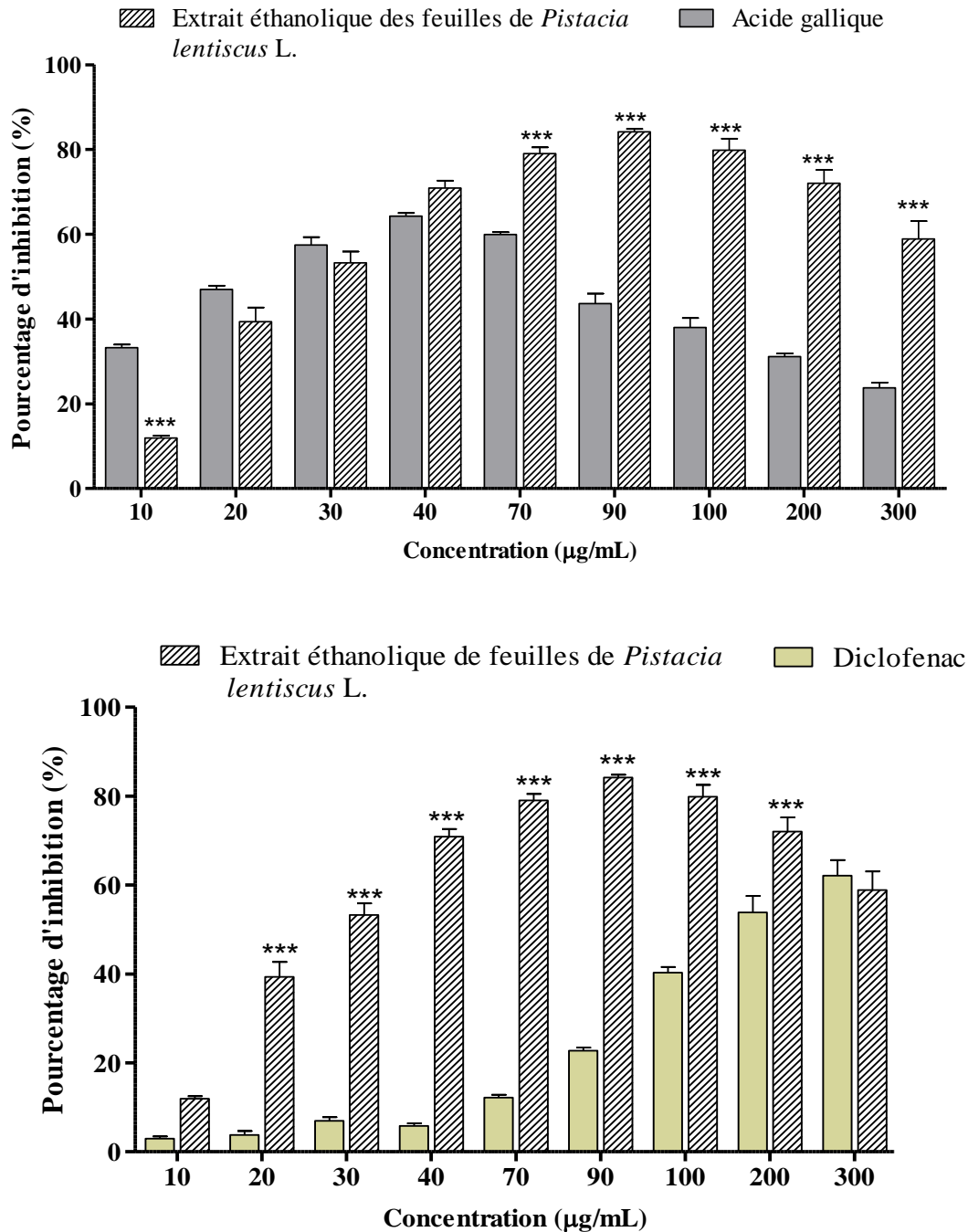


Figure 06 : Effet de l'extrait éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations. Cet effet est comparé à celui de l'acide gallique et diclofenac. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 présente la différence significative entre les pourcentages de protection, entre l'extrait éthanolique des feuilles et les molécules de références testées, acide gallique et diclofenac. One-way ANOVA, suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

On constate clairement que l'extrait éthanolique des feuilles et l'acide gallique présentent des effets inhibiteurs d'hémolyse des globules rouges, semblables aux

concentrations de 20 $\mu\text{g/mL}$ à 40 $\mu\text{g/mL}$. Au-delà de cette concentration, l'efficacité de l'extrait éthanolique des feuilles via la stabilisation de la membrane des érythrocytes est supérieure à celle de l'acide gallique.

Par ailleurs, le traitement des érythrocytes par l'extrait éthanolique des feuilles présente une inhibition d'hémolyse nettement supérieure à celle obtenue avec le diclofenac, aux concentrations testées.

La même activité a été évaluée pour l'extrait des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* et les résultats sont représentés dans la figure 07.

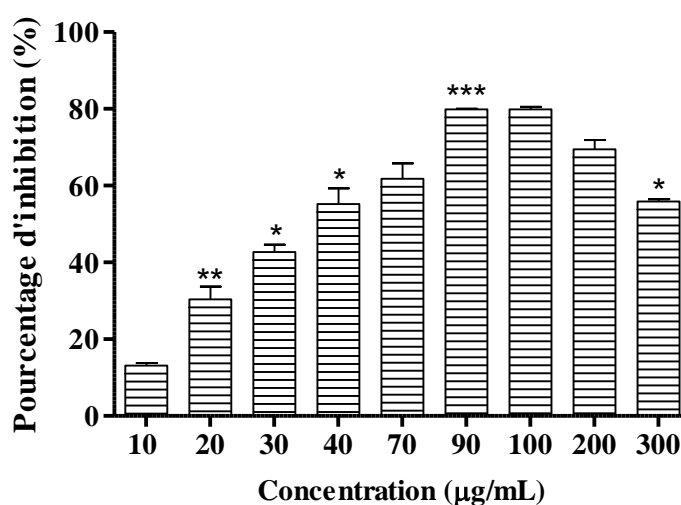


Figure 07 : Effet de l'extrait éthanolique des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 (comparaison de chaque concentration à la précédente) présente la différence significative entre les pourcentages de protection. One-way ANOVA, suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

L'extrait éthanolique des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* provoque une diminution significative de l'hémolyse des globules rouges, à partir de 20 $\mu\text{g/mL}$. Le pourcentage d'inhibition atteint 79.87 % à une concentration de 90 $\mu\text{g/mL}$ et commence à diminuer significativement à partir de 300 $\mu\text{g/mL}$.

La stabilisation de la membrane des érythrocytes, testée par l'extrait éthanolique des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, a été comparée à celle du diclofenac et de l'acide gallique. Les résultats observés sont exprimés dans la figure 08.

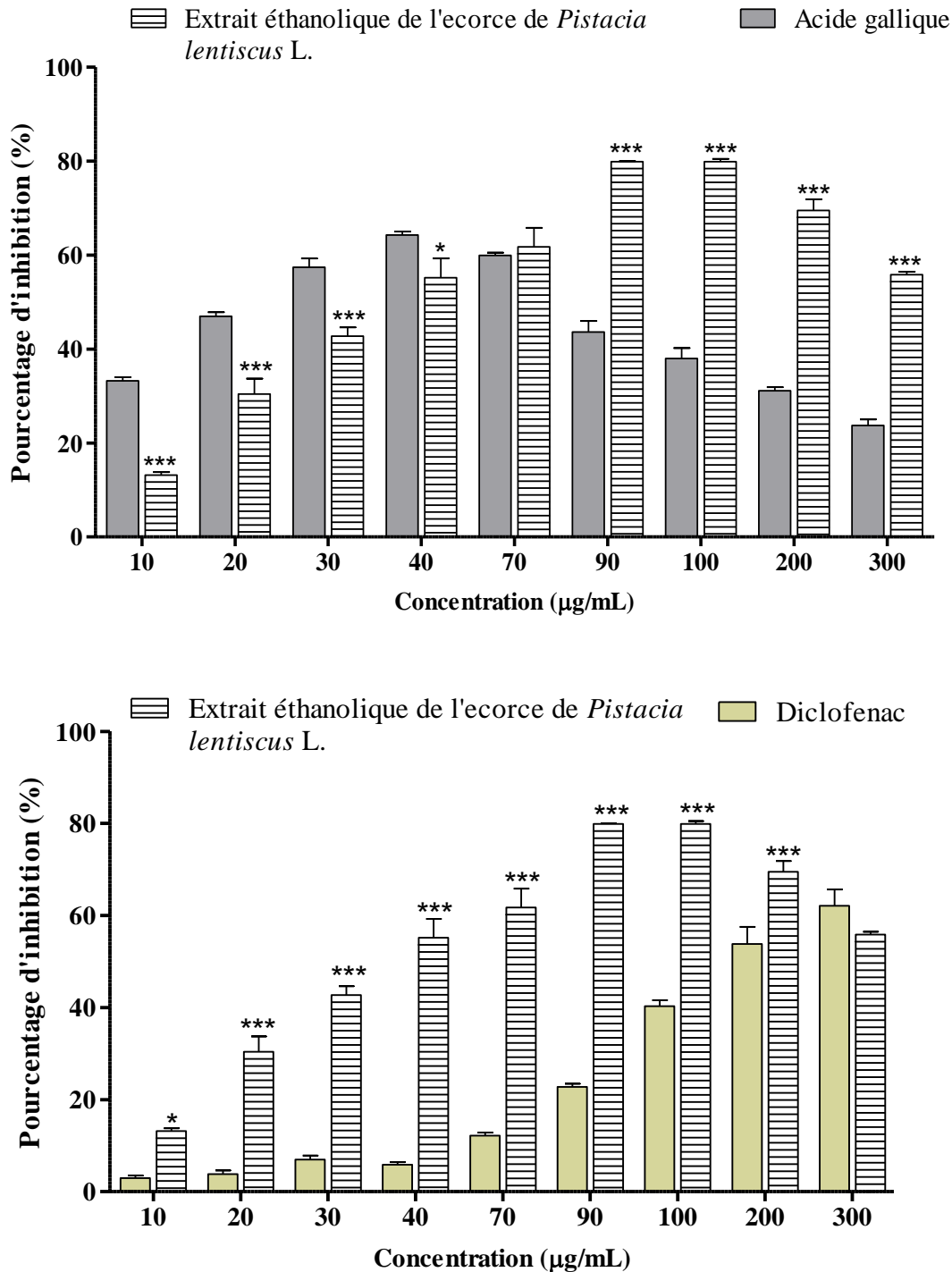


Figure 08 : Effet de l'extrait éthanolique des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* L. sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges, induit par hypotonie et chaleur, en fonction des concentrations. Cet effet est comparé à celui de l'acide gallique et diclofenac. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 présente la différence significative entre les pourcentages de protection, entre l'extrait éthanolique des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* et les molécules de références testées, acide gallique et diclofenac. One-way ANOVA, suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

L'effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de l'écorce des racines de *Pistacia lentiscus* L. et de l'acide gallique sur les globules rouges est similaire au niveau de deux concentrations de 40 et 70 µg/mL. A partir de 90 µg/mL, l'effet anti-hémolytique de l'extrait éthanolique des écorces des racines augmente significativement, contrairement à l'acide gallique qui diminue en fonction des concentrations.

L'effet protecteur de l'extrait éthanolique d'écorces des racines de *Pistacia lentiscus* est significativement différent comparativement à celui de diclofenac. Aux doses utilisées (10, 20, 30, 40, 70, 90, 100, 200 et 300 µg/mL), l'extrait éthanolique des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* donne un effet inhibiteur plus efficace que celui du diclofenac avec (13.15, 30.41, 42.72, 55.19, 61.76, 79.88, 79.89 et 69.49 %) respectivement.

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. La réaction inflammatoire dépasse parfois ses objectifs et cause des effets délétères (**Iwalewa et al., 2007 ; Medzhitov, 2010**). La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèses de type anti-inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes), ce sont des médicaments largement utilisés, mais dont les effets secondaires sont parfois graves, en particulier la toxicité sur le système rénal et digestif (irritations digestives pouvant aller jusqu'à l'ulcération gastrique) (**Das et al., 2010**). Dans le but de minimiser ces effets secondaires, les laboratoires développent de plus en plus de procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable des substances à activités biologiques et pharmacologiques très variées (**Hirasa et Takemasa, 1998**). Les extraits bruts, naturels isolés à partir des plantes utilisées en médecine traditionnelle, peuvent être des ressources de nouveaux médicaments (**Karmakar et al., 2011**).

Une plante médicinale locale (*Pistacia lentiscus* L.) a fait l'objet de cette étude. C'est une plante largement utilisée dans le traitement de la grippe, les douleurs abdominales, l'infection de la gorge, l'eczéma, l'herpès, le rhumatisme, ulcère de l'estomac,... (**Bozorgi et al., 2013**).

Pistacia lentiscus, comme toutes les plantes utilisées à des fins thérapeutiques, peuvent à fortes doses présenter une menace pour la santé de l'homme. Pour déterminer ces doses, un test de cytotoxicité a été réalisé sur les globules rouges humains.

Les résultats obtenus en présence de l'acide gallique, ont présenté une augmentation des pourcentages d'hémolyse des érythrocytes en fonction des concentrations. L'acide gallique, comme exemple de molécule de composés phénoliques, a présenté un effet hémolytique aux concentrations élevées (>80 µg/mL). Cela pourrait être incité par son comportement auto-oxydatif. En effet, des études ont indiqué que l'acide gallique à de fortes concentrations pourrait être rapidement oxydé, *in vivo* (37°C et pH 7.4), induisant l'augmentation de l'intensité radicalaire et le changement du potentiel redox à un état plus oxydatif. L'acide gallique produit alors une grande quantité d'espèces réactives oxygénées (ERO), qui peuvent endommager la membrane plasmique des globules rouges et détériorer sa fonction (**Mohanty et al., 2014 ; Hsieh et al., 2015**).

La toxicité des feuilles de *Pistacia lentiscus* observée, pourrait être expliquée par la présence de l'acide gallique, qui est l'un des constituants essentiel et majoritaire de cette plante, que ça soit sous sa forme libre ou liée (sous formes de dérivés galloyls liés au glucose ou à l'acide quinique) (**Romani et al., 2002**). Tandis que la partie écorce des racines de *Pistacia lentiscus*, aucune étude n'a été faite sur sa composition chimique à ce jour.

Les concentrations des extraits éthanoliques des feuilles et de l'écorce des racines de *Pistacia lentiscus*, n'ayant pas révélé d'effet hémolytique, ont été testées pour leur efficacité anti-inflammatoire via le test de stabilisation de la membrane des globules rouges humains. Les résultats se sont avérés très intéressants avec des pourcentages de protection aux alentours de 70 à 85 %, respectivement, à la concentration de 90 µg/mL.

De nombreux rapports précédents prouvent que des enzymes lysosomiales s'échappent de l'intérieure de leurs limites et pénètrent dans l'environnement extracellulaire pendant l'inflammation aiguë et chronique. Il est apparu qu'une approche simple à l'interruption du processus inflammatoire pourrait être l'utilisation des agents stabilisant la membrane du lysosome, en empêchant la libération des enzymes hydrolytiques par les lysosomes, qui causent la dégradation tissulaire et l'augmentation du stress oxydatif au sein des organes, des tissus. Ces enzymes endommagent les macromolécules des membranes cellulaires et induisent la peroxydation lipidique, aboutissant à la destruction de ces membranes, menant ainsi à l'activation de protéines responsables de l'inflammation, provoquant alors la production des espèces oxydatives (**Ignarro, 1974 ; Vadivu et Lakshmi, 2008 ; Oyedapo et al., 2015**).

Les membranes plasmiques demeurent des structures fluides et le maintien de la fluidité est un pré requis, pour la fonction, la viabilité, la croissance et la reproduction des cellules (**Portier et al., 2007**). De ce fait, des modèles divers ont été proposés et employés pour examiner l'efficacité anti-inflammatoire des extraits de plantes, notamment le test de stabilisation de la membrane de globule rouge, via l'exposition des érythrocytes à une solution hypotonique, ainsi qu'à une température élevée, en raison de la ressemblance de la membrane de lysosome avec celle du globule rouge (**Reshma et al., 2014 ; Oyedapo et al., 2015**).

L'exposition des érythrocytes aux substances nuisibles, comme le moyen hypotonique aboutit à la lyse de sa membrane accompagnée par l'hémolyse et l'oxydation d'hémoglobine.

Dans un milieu isotonique, les hématies tentent de maintenir un équilibre entre la concentration ionique du milieu extracellulaire et celle du milieu intracellulaire. Dans une solution hypotonique, l'afflux d'eau est plus grand que la fuite ainsi, l'eau pénètre dans l'hématie (selon son gradient de concentration), qui se gonfle et devient sphérique. La membrane cellulaire est relativement inélastique et rompt après seulement une augmentation de volume très légère, l'hématie subit ainsi l'hémolyse, qui provoque l'ouverture des pores membranaires, dénommés pores d'hémolyse, laissant la membrane cellulaire (le fantôme) vide (Seeman, 1967 ; Kalavani *et al.*, 2016).

Le maintien de la forme de disque biconcave des globules rouges est important pour leur fonction. D'après Ham et Shen, (1948), les érythrocytes exposés à des températures élevées, se divisent progressivement et changent leur morphologie pour devenir sphériques. Sous ces conditions, les hématies perdent leur capacité à résister à l'hémolyse en perturbant leurs membranes plasmiques. En effet, la température élevée favorisera un taux accru de glycolyse, qui accélérera la baisse du pH et ainsi, l'inhibition de synthèse de l'ATP, qui est utilisé pour le transport d'ions à travers la membrane cellulaire (principalement Na^+ , K^+ et Ca^{2+}), la phosphorylation des protéines membranaires et les principales réactions de la glycolyse. Également, la concentration réduite de l'ATP mène à la perte de la déformabilité et du volume cellulaire d'érythrocytes, qui sont étroitement liés au contenu intracellulaire de calcium et à la sortie des microparticules. Aussi, la concentration intracellulaire du K^+ est importante pour le maintien du contenu cellulaire en eau, ainsi la perte de K^+ cause la déshydratation du globule rouge, qui aboutit à la densité accrue et le changement de la forme membranaire d'une manière irréversible (Shinde *et al.*, 1999 ; Veal *et al.*, 2011).

Le diclofenac, anti-inflammatoire non stéroïdien, a été aussi testée et a démontré son potentiel anti-hémolytique à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ce médicament possède des propriétés analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire. Cette dernière est liée à son inhibition de la synthèse de prostaglandines et de thromboxane, en inhibant l'action des deux isoformes de l'enzyme membranaire cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), provoquant ainsi l'altération de la fonction des plaquettes, en inhibant leur agrégation (Ahmad *et al.*, 2013).

De plus, les résultats obtenus par **Ahmad et son équipe (2013)** ont montré que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), notamment le diclofenac, à des doses importantes, modifient la réponse inflammatoire en inhibant l'activation des neutrophiles et d'autres cellules inflammatoires, bloquant ainsi la production d'enzyme telle que collagénase et élastase.

Par ailleurs, le diclofenac, étant chargé négativement et son emplacement dans la région polaire des phosphatidylcholines modifie les interactions électrostatiques entre le phosphate des lipides et le groupement amine terminal. A des concentrations élevées, le diclofenac perturbe la structure de la bicouche membranaire en déplaçant les phosphatidylcholines et les sphingomyélines vers la monocouche intérieure, tandis que les phosphatidylsérines et les phosphatidylethanolamines vers l'extérieure. Ainsi, l'interaction du diclofenac, essentiellement avec le phosphatidylcholine dans la monocouche intérieure de la membrane des globules rouges, mène au changement de leur forme biconcave, ce qui augmente leurs résistance à l'entrée dans les capillaires induisant la diminution du flux sanguin, la perte d'oxygène et des dégât tissulaires (**Suwalsky et al., 2009**).

En parallèle, l'acide gallique a aussi fait l'objet de ce test anti-hémolytique, où l'activité s'est avéré très élevée, et supérieur même au médicament de synthèses, à savoir le diclofenac.

Il a été rapporté que l'acide gallique et ses dérivés sont responsables de l'inhibition de la fixation du NF- κ B, essentiels pour l'expression des cytokines pro-inflammatoires. De plus, la capacité des tanins à inhiber la phospholipase A2 est déjà établie, participant ainsi à l'inhibition des prostaglandines et des leucotriènes, au cours de l'inflammation (**Glaser et al., 1995; Kim et al., 2006 ; Chandra et al., 2007; Da Silva et al., 2008**).

La richesse des extraits de *Pistacia lentiscus* en composés phénoliques notamment l'acide gallique et les flavonoïdes à savoir la quercétine et la myricétine, pourrait contribuer à l'effet anti-inflammatoire prouvé dans cette étude.

Plusieurs recherches ont rapporté l'effet de quelques molécules appartenant à la famille des flavonoïdes et rapportée dans la composition chimique des feuilles de *Pistacialentiscus*, sur l'inhibition de la cyclooxygénase (COX) et la lipooxygénase (LOX) (quercétine et myricétine), l'inhibition de TNF- α et de NF- κ B (luteolin), l'inhibition de la réaction inflammatoire par le contrôle de la MAP kinase et/ou COX-2, l'inhibition de

l'activation des STAT-1, NF- κ B et l'expression d'iNOS ainsi que la production des NO \cdot (genisteine) (Xagorari *et al.*, 2001 ; Hämäläinen *et al.*, 2007 ; Hwang *et al.*, 2009).

D'une autre part, les flavonoïdes sont connus par leur activité antioxydante grâce à leurs groupements hydroxyles fortement réactifs. Ils exercent cette activité en provoquant l'arrêt de l'augmentation de la microviscosité des membranes des érythrocytes, induite par la peroxydation lipidique. En effet, ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres, susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement (C-H) situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés de la membrane, en piégeant, inactivant et stabilisant les radicaux libres (radicaux hydroxyles (OH \cdot), anions superoxydes (O \cdot) et radicaux peroxylipidiques), formant ainsi des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer les effets délétères, par la production des radicaux hydroxyles (OH \cdot) (Ghedira, 2005 ; Chaudhuri *et al.*, 2007 ; Mladěnka *et al.*, 2011).

Ces antioxydants naturels possèdent aussi un effet anti-hémolytique, en stabilisant la membrane des globules rouges contre la lyse hypotonique, maintenant ainsi leur intégrité membranaire (la distribution asymétrique des phospholipides) (Chaudhuri *et al.*, 2007). De plus ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (Mladěnka *et al.*, 2011).

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable des molécules bioactives, ayant montré leurs efficacités dans le traitement de diverses pathologies, tout en prévenant l'apparition des effets secondaires observés, lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

Pistacia lentiscus possède un pouvoir pharmacologique, dont les indications thérapeutiques sont nombreuses. L'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* a été évaluée, via le test de stabilisation de la membrane des globules rouges, par induction de l'hémolyse en exposant ces derniers à un milieu hypotonique associé à une température élevée.

In vitro, les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus* ont révélé une activité anti-hémolytique importante. Ces résultats ont été comparés aux molécules de référence, l'acide gallique qui est un composé majoritaire de cette plante, ainsi que le diclofenac comme anti-inflammatoire non stéroïdien.

En effet, la stabilisation de la membrane des globules rouges, par les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, pourrait être liée à leur composition chimique qui est riche en polyphénols tels que l'acide gallique et les flavonoïdes, possédant des propriétés antioxydante et anti-inflammatoire.

A l'issue de cette étude, il ressort que, l'activité anti-hémolytique révélée par les extraits éthanoliques pourrait avoir un effet sur la stabilité de la membrane lysosomale, qui est semblable à celle des globules rouges, et pourrait empêcher ainsi la sortie des constituants lysosomals au cours de l'inflammation.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Pistacia lentiscus* montre que cette plante possède un pouvoir pharmacologique, ce qui valide son usage traditionnel pour le soulagement de diverses affections inflammatoires.

Ces études doivent être orientées vers la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires des composés actifs des extraits de *Pistacia lentiscus*, et l'évaluation de leurs effets sur le processus inflammatoire, ainsi que les enzymes impliquées dans la production des espèces oxygénées réactives.

- **Ahmad, I., Qureshi, T. A., Sadique, U., Khan, S. A., Ahmed, S., Rehman, Z. U., ... & Mushtaq, M. (2013).** Hematological effects of diclofenac sodium in goat. *The J of Animal and Plant Sci*, 23, 103-107.
- **Asehnoune, K., & Édouard, A. (2006).** Réponse inflammatoire et polytraumatisme: mise au point. *Réanimation*, 15(7), 568-575.
- **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1), 69-81.
- **Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., ... & Atmani, D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2), 303-309.
- **Auddy, B., Ferreira, M., Blasina, F., Lafon, L., Arredondo, F., Dajas, F., ... & Mukherjee, B. (2003).** Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2), 131-138.
- **Balan, K. V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, J. H., ... & Pantazis, P. (2007).** Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*. *Phytomedicine*, 14(4), 263-272.
- **Barnes, P. J. (1998).** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science*, 94(6), 557-572.
- **Barton, G. M. (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 413-420.
- **Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M. H., Shams-Ardekani, M. R., & Rahimi, R. (2013).** Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 2013.

- **Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M. and Stocker, P. (2008).** Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc.* 85:921–924.
- **Charles, N. S., Peter, A. W. & Derek, W. G. (2010).** Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press*, 2-3.
- **Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2007).** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 42-48.
- **Chen, J. Y., & Huestis, W. H. (1997).** Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1323(2), 299-309.
- **Chippada, S. C., Volluri, S. S., Bammidi, S. R., & Vangalapati, M. (2011).** In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan J Chem*, 4(2), 457-460.
- **Chou, C. T. (1997).** The Antiinflammatory Effect of an Extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F on Adjuvant-induced Paw Oedema in Rats and Inflammatory Mediators Release. *Phytotherapy research*, 11(2), 152-154.
- **Chrétien, J-P. (1993).** Brundi l’histoire retrouvée 25 ans de métier d’histoire en Afrique. Edition Karthala Paris.
https://books.google.dz/books?id=pbrTTbyrX3sC&pg=RA1-PA126&dq=historique+de++pistacia+lentiscus&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwiz6pyzo vnTAhXHCcAKHdwUC_gQ6AEIIDAA#v=onepage&q=historique%20de%20%20pistacia%20lentiscus&f=false. Consulté en ligne le 22.03.2017.
- **Cillard, J., & Cillard, P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.

- **Coujard, R. Poirier, J. Racodot, J. (1980).** Précis d'histologie Humaine. Edition Masson.Paris.https://books.google.dz/books?id=Ost7PN6plaUC&pg=PA70&dq=membrane+d'un+lysosome&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjtsK_Ls4TUAhULiRoKHcWuDIMQ6AEIJjAB#v=onepage&q=membrane%20d'un%20lysosome&f=false. Consulté en ligne le 17.04.2017.
- **Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- **Cuvillon, P., Viel, E. (2002).** Anti-inflammatoires non stéroïdiens anti-COX-2. Une nouvelle approche thérapeutique de la douleur aiguë ? *Le Courrier de l'algologie (1)*, 19-23.
- **Da Silva, S. L., Calgarotto, A. K., Chaar, J. S., & Marangoni, S. (2008).** Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA 2 activity. *Toxicon*, 52(6), 655-666.
- **Dangles O. (2006).** Propriétés chimiques des polyphénols dans les polyphénols en agroalimentaire. *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. Lavoisier.* 29-50.
- **Das K., Tiwari R.K.S. and Shrivastava D.K. (2010).** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2); 104-111.
- **Fiorucci S., Golebiowski J., Cabrol-Bass D., Antonczak S. (2007).** DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 55: 903-911.
- **Frutos, P., Hervas, G., Giráldez, F. J., & Mantecón, A. R. (2004).** Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(2), 191-202.
- **Ganesh, G., Saurabh, M. & Sarada, N.C. (2013).** Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Leaf Extract of Traditionally Used Medicinal Plant *Mimusops elengi* L. *Pharm. Sci. & Res. Vol.5(6)*, 2013, 125 – 130.

- **Garrido, G., González, D., Lemus, Y., Garcia, D., Lodeiro, L., Quintero, G., ... & Delgado, R. (2004).** In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). *Pharmacological Research*, 50(2), 143-149.
- **Gautier, A. (1874).** Chimie appliquée à la physiologie a la pathologie et a l'hygiène. Librairie F. Savy, Paris. Consulté en ligne le 28.03.2017.
- **Ghedira, K. (2005).** Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- **Glaser, K. B., Sung, M. L. A., Hartman, D. A., Lock, Y. W., Bauer, J., Walter, T., & Carlson, R. P. (1995).** Cellular and topical in vivo inflammatory murine models in the evaluation of inhibitors of phospholipase A2. *Skin Pharmacology and Physiology*, 8(6), 300-308.
- **Govindappa, M., & Poojashri, M. N. (2011).** Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3(3), 43-51.
- **Haber, F., & Weiss, J. (1934, November).** The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. In *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* (Vol. 147, No. 861, pp. 332-351). The Royal Society.
- **Halliwell, B. (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 52(8), 253-265.
- **Ham, T. H., & Shen, S. C. (1948).** Studies on the destruction of red blood cells; thermal injury; action of heat in causing increased spheroidicity, osmotic and mechanical fragilities and hemolysis of erythrocytes; observations on the mechanisms of destruction of such erythrocytes in dogs and in a patient with a fatal thermal burn. *Blood*, 3(4), 373.

- **Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007).** Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*, 2007.
- **Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007).** Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950-988.
- **Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., & Reginster, J. Y. (2001).** Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue médicale de Liege*, 56(6), 433-42.
- **Henzen, C. (2003).** Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. In *Schweiz Med Forum* (Vol. 19, pp. 442-6).
- **Hirasa K., Takemasa M. (1998).** Spice science and technology. New York: Marcel Dekker.
- **Hold, G. L., & El-Omar, M. E. (2008).** Genetic aspects of inflammation and cancer. *Biochemical Journal*, 410(2), 225-235.
- **Hsieh, C. L., Lin, C. H., Chen, K. C., Peng, C. C., & Peng, R. Y. (2015).** The teratogenicity and the action mechanism of gallic acid relating with brain and cervical muscles. *PloS one*, 10(6), e0119516.
- **Huang, M. H., Huang, S. S., Wang, B. S., Wu, C. H., Sheu, M. J., Hou, W. C., ... & Huang, G. J. (2011).** Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo. *Journal of ethnopharmacology*, 133(2), 743-750.
- **Hwang, J. T., Lee, Y. K., Shin, J. I., & Park, O. J. (2009).** Anti-inflammatory and Anticarcinogenic Effect of Genistein Alone or in Combination with Capsaicin in TPA-Treated Rat Mammary Glands or Mammary Cancer Cell Line. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171(1), 415-420.

- **Ignarro, L. J. (1974).** Regulation of lysosomal enzyme secretion: role in inflammation. *Agents and Actions*, 4(4), 241-258.
- **Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2007).** Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6(25).
- **Jick, H. (1994).** Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Lancet*, 343(8900), 769-772.
- **Kalavani, R., Banu, R. S., Jeyanthi, K. A., Sankari, T. U., & Kanna, A. V. (2016).** Evaluation of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Pithecellobium dulce* (Benth) extract. *Biotechnological Research*, 2(4), 148-154.
- **Karmakari I., Dolai N., Saha P., Sarkar N., Bala A., Kanti P. (2011).** Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient Pharmacology Experimental medicine*, 11:221-228.
- **Karthik, K., Kumar, B. R. P., Priya, V. R., Kumar, S. K., & Rathore, R. S. B. (2013).** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(5), 729.
- **Kierszenbaum, A-L. (2002).** Histologie et biologie cellulaire, une introduction à l'anatomie pathologique. Edition De boeck.
https://books.google.dz/books?id=iR0g_41022sC&pg=PA67&dq=membrane+d'un+lysosome&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjtsK_Ls4TUAhULiRoKHcWuDIMQ6AEILTA C#v=onepage&q=membrane%20d'un%20lysosome&f=false. Consulté en ligne le 22.05.2017.
- **Kim, S. H., Jun, C. D., Suk, K., Choi, B. J., Lim, H., Park, S., ... & Shin, T. Y. (2006).** Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological Sciences*, 91(1), 123-131.

- **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- **Lahsissene, H., Kahouadji, A., & Hseini, S. (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia, Revue de Botanique*.
- **Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011).** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- **Lev, E., & Amar, Z. (2000).** Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1), 191-205.
- **Lev, E., & Amar, Z. (2002).** Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2), 131-145.
- **Levy, J. H., & Kelly, A. B. (1993).** Inflammation and cardiopulmonary bypass. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*, 40(11), 1009-1015.
- **Lin, Y. T., Vатtem, D., Labbe, R. G., & Shetty, K. (2005).** Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. *Process Biochemistry*, 40(6), 2059-2065.
- **Lioté, F. (2011).** Physiopathologie et traitement de l'inflammation goutteuse. *Revue du rhumatisme*, 78, S122-S128.
- **Ma, L., Liu, Z., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. (2000).** Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red blood cells by green tea polyphenols. *Chinese science bulletin*, 45(22), 2052-2056.
- **Manicone, A. M., & McGuire, J. K. (2008, February).** Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 1, pp. 34-41). Academic Press.

- **Manthey, J. A. (2000).** Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*, 7(S1).
- **Marsolais, D., & Frenette, J. (2005).** Inflammation et réparation tendineuse. *médecine/sciences*, 21(2), 181-186.
- **Mayol, K. Cavalié, F. & Davoust-Nataf, N. (2013).** Les médiateurs de l'inflammation. Anonyme.
- **Medzhitov, R. (2010).** Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771-776.
- **Mladěnka, P., Macáková, K., Filipický, T., Zatloukalová, L., Jahodář, L., Bovicelli, P., & Saso, L. (2011).** In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(5), 693-701.
- **Mohanty, J., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2014).** Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in physiology*, 5, 84.
- **Narendra Sharath Chandra, J. N., Ponnappa, K. C., Sadashiva, C. T., Priya, B. S., Nanda, B. L., Veerabasappa Gowda, T., ... & Rangappa, K. S. (2007).** Chemistry and structural evaluation of different phospholipase A2 inhibitors in arachidonic acid pathway mediated inflammation and snake venom toxicity. *Current topics in medicinal chemistry*, 7(8), 787-800.
- **O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., & Shanahan, F. (2004).** The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of cellular physiology*, 201(2), 167-180.
- **Okoli, C. O., & Akah, P. A. (2004).** Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv (Araceae). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 79(3), 473-481.

- **Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., & Pedersen, B. K. (1999).** Pro-and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *The Journal of physiology*, 515(1), 287-291.
- **Oyedapo, O. O., Makinde, M. A., Ilesanmi, M. G., Abimbola, O. E., Akinwunmi, F. K., & Akinpelu, A. B. (2015).** Biological activities (anti-inflammatory and anti-oxidant) of fractions and methanolic extract of *Philonotis hastata* (Duby wijk & Margadant). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM)*, 12(4), 50-55.
- **Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009).** A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell biochemistry and biophysics*, 53(2), 75-100.
- **Portier, K., Kirschvink, N., Fellmann, N., Coudert, J., & Lekeux, P. (2007).** Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 151, No. 2, pp. 101-106). Université de Liège.
- **Raimi, M. M., & Oyedapo, O. O. (2009).** Bioactivity-guided evaluation of the root extract of *Plumbago zeylanica*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(4).
- **Reddy, C. S. S., Subramanyam, M. V. V., Vani, R., & Devi, S. A. (2007).** In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. *Toxicology in vitro*, 21(8), 1355-1364.
- **Reshma, Arun, K.P., & Brindha, P. (2014).** In vitro anti-inflammatory, antioxidant and nephroprotective studies on leaves of *Aegle marmelos* and *Ocimum sanctum*. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 7, Issue 4, 2014, 121-129.
- **Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005).** Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1711-1723.

- **Risser, A., Donovan, D., Heintzman, J., & Page, T. (2009).** NSAID prescribing precautions. *American family physician*, 80(12), 1371-8.
- **Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., & Tattini, M. (2002).** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 79-86.
- **Ryan, G. B., & Majno, G. (1977).** Acute inflammation. A review. *The American journal of pathology*, 86(1), 183.
- **Sadrzadeh, S. M., Graf, E., Panter, S. S., Hallaway, P. E., & Eaton, J. W. (1984).** Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 259(23), 14354-14356.
- **Sakat, S., Juvekar, A. R., & Gambhire, M. N. (2010).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 146-155.
- **Sang-Hyun Kim, Chang-Duk Jun, Kyongho Suk, Byung-Ju Choi, Hyunjeung Lim, Seunja Park, Seung Ho Lee, Hye-Young Shin, Dae-Keun Kim & Tae-Yong Shin (2006).** Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. *Toxicol Sci* ; 91 (1): 123-131. doi: 10.1093/toxsci/kfj063.
- **Scott, A., Khan, K. M., Cook, J. L., & Duronio, V. (2004).** What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus?. *British journal of sports medicine*, 38(3), 248-249.
- **Seeman, P. (1967).** Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. *The Journal of cell biology*, 32(1), 55-70.
- **Serhan, C. N., Ward, P. A., & Gilroy, D. W. (2010).** *Fundamentals of inflammation*. Cambridge University Press.
- **Shinde, U. A., Phadke, A. S., Nair, A. M., Mungantiwar, A. A., Dikshit, V. J., & Saraf, M. N. (1999).** Membrane stabilizing activity—a possible mechanism of action

for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia*, 70(3), 251-257.

- **Suwalsky, M., Manrique, M., Villena, F., & Sotomayor, C. P. (2009).** Structural effects in vitro of the anti-inflammatory drug diclofenac on human erythrocytes and molecular models of cell membranes. *Biophysical chemistry*, 141(1), 34-40.
- **V Stankov, S. (2012).** Definition of inflammation, causes of inflammation and possible anti-inflammatory strategies. *The open inflammation journal*, 5(1).
- **Vadivu, R. & Lakshmi, K.S. (2008).** In vitro and In vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchensis* (Lour) Moore ssp *laurina*. *Bangladesh J Pharmacol* 2008; 3: 121-124.
- **Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- **Veale, M. F., Healey, G., & Sparrow, R. L. (2011).** Effect of additive solutions on red blood cell (RBC) membrane properties of stored RBCs prepared from whole blood held for 24 hours at room temperature. *Transfusion*, 51(s1).
- **Weill, B., Batteux, F. & Dhainaut, J. (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
<https://www.amazon.fr/Immunopathologie-r%C3%A9actions-inflammatoires-Bernard-Weill/dp/2804141772>. Consulté le 25.03.2017.
- **Weissmann, G. (1966).** Lysosomes and joint disease. *Arthritis & Rheumatology*, 9(6), 834-840.
- **Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economou, M., Fotsis, T., & Roussos, C. (2001).** Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296 (1), 181-187.

Résumé :

Pistacia lentiscus L. (Anacardiaceae) est une plante utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des pathologies inflammatoires. Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, sur un modèle de stabilisation de la membrane des globules rouges vis-à-vis de l'induction d'hémolyse, par hypotonie associée à une température élevée.

Les extraits éthanoliques des feuilles et des écorces des racines de *Pistacia lentiscus*, à des concentrations de 90 et 100 µg/mg, ont exhibé d'une façon significative, un effet anti-hémolytique de l'ordre de 84.18 % et de 79.89 % respectivement pour les feuilles et les écorces des racines.

Cet effet est comparable à celui révélé par l'acide gallique, à la concentration de 40µg/mL et nettement supérieur à l'effet démontré par le diclofenac.

Ces résultats valident scientifiquement l'utilisation traditionnelle de *Pistacia lentiscus* autant qu'un anti inflammatoire.

Mots clés : Inflammation, anti-inflammatoire, *Pistacia lentiscus* L., globule rouge, stabilité membranaire, diclofenac, acide gallique.

Abstract :

Pistacia lentiscus L. (Anacardiaceae) is a traditional plant used for the treatment of the inflammatory pathologies. This study aimed to estimate the anti-inflammatory activity of leaf and root bark ethanolic extracts of *Pistacia lentiscus*, on a model of red blood cells stabilization membrane towards the induction of hémolyse, by hypotonic solution associated with a high temperature.

Leaves and root bark ethanolic extracts of *Pistacia lentiscus*, in concentrations of 90 and 100 µg / mg, showed in a significant anti-hémolytic activity of 84.1 and of 79.89 %, respectively. This effect is comparable to that revealed by the Gallic acid, at the concentration of 40µg / mL and clearly upper to the effect demonstrated by the diclofenac.

These results validate scientifically the traditional use of *Pistacia lentiscus* as much as an inflammatory.

Key words : Inflammation, anti-inflammatory, *Pistacia lentiscus* L., red blood cell, membrane stabilization, diclofenac, gallic acid.