

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Filière : Biologie
Option : Génétique appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Etude de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*,
des extraits du fruit de *Pistacia lentiscus* sur
la stabilité membranaire du globule rouge

Présenté par :

ADMAM Souad & BOUMENDJEL Meriem

Soutenu le : **20 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mme. Sebaihi S.	MAA	Président
Mme. Rahmani-Berboucha M.	MAA	Encadreur
Mr. Brihi N.	MCB	Examineur

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Nos remerciements s'adressent en premier lieu au bon Dieu tout puissant, de nous avoir donné la force et la volonté pour réaliser et accomplir à terme ce travail.

Nos remerciements s'adressent en deuxième lieu à notre promotrice, **M^m Rahmani-Barboucha M.** d'avoir accepté de nous encadrer, pour sa disponibilité, ses conseils et surtout sa patience tout au long de ce travail.

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude aux membres de jury :

Mme Sebaihi S. d'avoir accepté de présider ce jury.

M^r Bribi N. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un spécial remerciement s'adresse à **M^r Ramdani N.** pour sa générosité, gentillesse et son aide pour accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier le laboratoire d'analyse médicale **D^r Moualek** et tout particulièrement **Mme Nacri Daouia** et tous ceux qui ont accepté d'être des donateurs de sang.

Notre gratitude s'adresse aussi à tout le personnel du laboratoire génétique : **M^m Atmani D.**, **Naima**, **Farah**, **Malika** et **Asma** d'avoir été à notre écoute et avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Nous témoignons enfin notre reconnaissance à tous ceux et celles ayant contribué de pré ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçois ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A mon très cher père

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A la mémoire de mon grand père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi, le malheur de t'avoir perdu nous ferons jamais oublier le bonheur de t'avoir connu. Repose en paix jeddi a3ziz, puisse le tout puissant t'accueillir en son vaste paradis.

Mes frères et belles sœurs

A vous : Nassim et Saida, Azzedine et Mira, Malek et Nora, Brahim et Bania, et mon petit frère Toufik, votre encouragement et soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, merci d'être toujours à mes côtés. En témoignage de mon amour et ma grande affection, je vous prie de trouver dans ce travail mon sincère attachement.

Mes neveux et nièces

Mes poupées Manel et Rachel, mes très chers Raouf et Ayoub, malgré votre jeune âge, vous aviez su me combler d'amour et bonheur et vous avez rendu ma vie en rose rien que par vos câlins, mots doux et sourires ...vous êtes la lumière de ma vie.

Ma grande famille

A mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses, à mes chers cousines et cousins et à tous les membres de la famille ADMAM et MESSAOUDENE que dieu vous garde et vous protège.

Mes amis

À mon binôme Meriem, Narimane et Hanane, à mes copines Biba, Sabrina et Soraya vous avez pris la place de sœurs dans ma vie. Spécialement à vous mes chers Rym et Massi en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble, espérant que le meilleur est à venir, merci pour votre soutien et encouragements, merci pour vous ma deuxième famille.

A toute la promotion 2017 génétique appliquée, ma très chère promotrice Mme Rahmani et à tous mes enseignants.

Je vous dédie tous ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé, bonheur et succès.

.....*Souad*.....

Dédicace



DESIGNED BY
TASSELTOPPERS

Je dédie ce travail :

*A mes très chers **parents** et **grands-parents** pour leur amour, leur sacrifice, leur encouragement, pour tout ce qu'ils m'ont apporté et les valeurs qu'ils m'ont enseignées, pour leur soutien et leur confiance notamment durant mes études.*

*A ma sœur **Ghania** et son mari **Mourad**.*

*A ma sœur **Lydia**, son mari **Mourad** et leurs adorable fille **Manissa**.*

*A ma petite sœur **Chayema**.*

*A mon cher **Farid** pour son amour, ses conseils, son encouragement et son soutien durant mon parcours universitaire.*

*A mes **oncles**, mes **tantes** et toute ma famille.*

*A ma **binôme** **Souad** et mes **copines** **Hiba**, **Rym**, **Hanane**, **Narimane** et toute la promotion de génétique appliquée.*

Meriem.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS^{o+} : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien.

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien.

ANOVA : Analysis of variance.

AP-1 : Activator protein-1.

ATP : Adénosine-triphosphate.

COX : Cyclo-oxygénase.

DPPH^o : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

ELAM-1 : Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1.

FRN : Formes réactives de l'azote.

FRO : Formes réactives de l'oxygène.

GC : Glucocorticoïdes.

GRh : Globule rouge humain.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

Hb : Hémoglobine.

HCO₃⁻ : Hydrogénocarbonate.

HOCl : Acide hyperchloreux.

IC₅₀ : 50% inhibitory concentration.

ICAM : Intercellular adhesion molecule.

IgG : Immunoglobulin G.

IL : Interleukine.

MPO : Myéloperoxydase.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NFκB : Nuclear factor-kappa B.

NO° : Radical oxyde nitrique.

O₂° : Anion superoxyde.

OH° : Radicale hydroxyle.

ONOO° : Peroxynitrite.

RO° : Radicale alkoxyde.

ROO° : Radicale peroxyde.

TGFβ : Transforming growth factor beta.

TNF : Tumor necrosis factor.

VCAM : Vascular cell adhesion molecule.

LISTE DES Figures

Figure 1 : Schéma représentant l'explosion oxydative chez les polynucléaires	5
Figure 2 : schéma de la membrane érythrocytaire	13
Figure 3 : Photographie des feuilles, graines et écorces des racines de <i>P.lentiscus</i>	16
Figure 4 : Réaction de test DPPH°	20
Figure 5 : Effet de l'acide gallique sur l'hémolyse des globules rouges.....	23
Figure 6 : pourcentage d'hémolyse de l'extrait aqueux et l'extrait ethanolique des fruits de <i>P. lentiscus</i>	24
Figure 7 : comparaison entre le pourcentage d'hémolyse de l'extrait ethanolique et de l'extrait aqueux des fruits de <i>P. lentiscus</i> avec l'acide gallique	24
Figure 8 : comparaison entre le pourcentage d'hémolyse de l'extrait ethanolique et aqueux des graines de <i>P. lentiscus</i>	24
Figure 9 : Effet du diclofinac et l'acide gallique sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges humains induit par l'hypotonie et la chaleur.....	27
Figure 10 : Effet de l'extrait aqueux et de l'extrait ethanolique des fruits de <i>P.lentiscus</i> sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges humaines (hRBC) induit par l'hypotonie et la chaleur	27
Figure 11 : Comparaison entre l'activité anti-hémolytique de l'extrait aqueux des fruits de <i>P. lentiscus</i> et le diclofinac et l'acide gallique	29
Figure 12 : Comparaison entre l'activité anti-hémolytique de l'extrait ethanolique des fruits de <i>P. lentiscus</i> et l'acide gallique et le diclofinac.....	30
Figure 13 : Comparaison entre l'activité anti-hémolytique de l'extrait aqueux et l'extrait ethanolique des fruits de <i>P. lentiscus</i>	31
Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'acide gallique, la Quercitine, le Baicalin et l'extrait ethanolique et aqueux des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i>	32
Figure 15 : Pourcentage d'inhibition de l'ABTS ^{o+} de l'acide gallique, la Quercitine, le Baicalin et l'extrait ethanolique et aqueux des fruits de <i>P. lentiscus</i>	33

LISTE DES Tableaux

Tableau I : Quelques plantes à activité anti-inflammatoire.....	8
Tableau II : Taxonomie de <i>Pistacia lentiscus</i>	9
Tableau III : Valeurs IC ₅₀ obtenus par le test de DPPH° et de l'ABTS°+ des extraits aqueux et éthanolique des graines de <i>Pistacia lentiscus</i> ainsi que les molécules de référence testées.....	34

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

I. 1. Définition de l'inflammation.....	2
I. 2. Médiateurs de la réaction inflammatoire	2
I. 3. Types d'inflammation	3
I. 3. 1. Inflammation aiguë.....	3
I. 3. 1.1. Phase vasculaire	3
I. 3. 1. 2. Phase cellulaire.....	4
I. 3. 1. 3. Phase de résolution	5
I. 3. 2. Inflammation chronique	6
I. 4. Anti-inflammatoires	6
I. 4. 1. Anti-inflammatoires synthétiques	6
I. 4. 1. 1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	6
I. 4. 1. 2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes	7
I. 4. 2. Effets indésirables communs des anti-inflammatoires	7
I. 4. 3. Anti-inflammatoires naturels	8
I. 5. <i>Pistacia lentiscus</i>	9
I. 5. 1. Description botanique	9
I. 5. 2. Taxonomie	9
I. 5. 3. Localisation géographique	9
I. 5. 4. Utilisations traditionnelles	10
I. 5. 5. Composition chimique de <i>Pistacia lentiscus</i>	10
I. 5. 6. Activités biologiques de <i>Pistacia lentiscus</i>	11
I. 6. Méthodes d'évaluation des agents anti-inflammatoires	12
I. 7. Globule rouge.....	12
I. 7. 1. Structure du globule rouge	13
I. 7. 1. 1. Membrane du globule rouge.....	13

I. 7. 1. 2. Squelette membranaire du globule rouge.....	13
I. 7. 1. 3. Enzymes érythrocytaires.....	13
I. 7. 1. 4. Hémoglobine.....	14
I. 8. Mécanisme d'hémolyse induit chez les érythrocytes	14

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel	16
II.1.1. Extraits ethanologique et aqueux du fruit de <i>Pistacia lentiscus</i>	16
II.1.2. Echantillons de sang humain.....	16
II.2. Méthodes	17
II.2.1. Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh)	17
II.2.2 Test de cytotoxicité des extraits ethanologique et aqueux du fruit de <i>Pistacia lentiscus</i>	17
II.2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i> , des extraits ethanologique et aqueux des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges.....	19
II.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits ethanologique et aqueux des graines du fruit de <i>Pistacia lentiscus</i>	20
II.2.4.1. Activité antiradicalaire du DPPH [°]	20
II.2.4.2. Activité antiradicalaire de l'ABTS ^{°+}	21
II.2.5. Evaluation statistique des résultats	22

CHAPITRE III : Résultats et discussion

III. 1. Résultats	24
III. 1. 1. Test de cytotoxicité.....	24
III. 1. 2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, <i>in vitro</i> , des extraits ethanologique et aqueux des fruits de <i>Pistacia lentiscus</i> par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges.....	26
III. 1. 3. Evaluation de l'activité antioxydant	31
III. 1. 3. 1. Evaluation du pouvoir anti-radicalaire par DPPH [°]	31
III. 1. 3. 2. Evaluation du pouvoir anti-radicalaire par ABTS ^{°+}	32
III. 2. Discussion	34
Conclusion et perspectives.....	39

Références bibliographiques41

Annexes

Introduction

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme, dont le but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. D'une autre part, la surproduction des espèces réactives d'oxygènes au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant, qui est impliqué dans l'apparition des maladies inflammatoires chroniques (**Rousselet et al., 2005**).

La thérapeutique anti-inflammatoire fait appel à diverses molécules synthétiques, les glucocorticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Bien qu'efficaces, ces médicaments présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent limiter leur utilisation à long terme (**Lee et Feldman., 1997**). De ce fait, la recherche de substances d'origine végétale douées d'activités anti-inflammatoires s'avère très utile pour l'amélioration de la santé humaine.

Aujourd'hui, les plantes médicinales connaissent un succès accru et sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, notamment dans les traitements de maladies impliquant un processus inflammatoire. *Pistacia lentiscus* L., connue dans la région de Kabylie sous le nom d'Amadagh, est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge et l'eczéma (**Scherrer et al., 2005 ; Gardeli et al., 2008 ; Boukeloua et al., 2011**).

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits ethanologique et aqueux du fruit de *Pistacia lentiscus*, par la méthode de stabilisation membranaire en utilisant les globules rouges humains (GRh), ainsi qu'un test complémentaire concernant l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis, de l'ABTS^{o+} et du DPPH^o.

*Synthèse
bibliographique*

I. 1. Définition de l'inflammation

La réponse inflammatoire est une série de mécanismes dynamiques bien coordonnés, en conséquence d'une réponse immunitaire contre une agression causée par des microorganismes, des agents physiques ou chimiques, une blessure ou une brûlure (Russo-Marie, 1998 ; Gokhale *et al.*, 2002 ; Hou *et al.*, 2004). Elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé, par divers processus de réparation (Nathan, 2002 ; Barton, 2008). Les symptômes caractéristiques de l'inflammation sont la douleur, le gonflement, la rougeur et la sensation de la chaleur (Rousselet *et al.*, 2005).

I. 2. Médiateurs de la réaction inflammatoire

Différentes molécules appelées médiateurs de l'inflammation, libérées par de nombreuses cellules, interviennent dans le démarrage et le contrôle des étapes de la réaction inflammatoire (Pasquier, 1995). On compte parmi lesquels des cytokines, des prostanoïdes, des leucotriènes, des neuropeptides, des fractions du complément ou encore des métalloprotéases (Henrotin *et al.*, 2001). Les rôles et l'implication de ces facteurs dans la réaction inflammatoire sont résumés en annexes 1.

D'une autre part, lors de l'inflammation les cellules phagocytaires, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, sous l'action d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase produit des formes réactives de l'oxygène (FRO) et de l'azote (FRN) (Babior, 1984). Les FRO possèdent une grande réactivité et sont constituées essentiellement par des radicaux libres de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radicale hydroxyle (OH^{\cdot}), le radicale peroxyde (ROO^{\cdot}) et le radicale alkoxyde (RO^{\cdot}) (Pasquier, 1995). Dans les processus physiologiques normaux, les FRO jouent un rôle crucial telle que la réponse aux facteurs de croissance, la réponse immunitaire en médiant la signalisation cellulaire et l'élimination apoptotique des cellules endommagées (Holbrook et Ikeyama, 2002). Le radical oxyde nitrique (NO^{\cdot}) est un agent vasodilatateur synthétisé à partir de la L-arginine notamment par les cellules endothéliales, les phagocytes et certains neurones cérébraux sous l'action du nitrite oxyde synthase (Pasquier, 1995).

Le NO° interagit avec l'anion superoxyde (O₂°) pour produire du peroxynitrite (ONOO°) qui possède un pouvoir cytotoxique et est capable d'activer la production des prostaglandines (**Ravat et al., 2011**).

Si une production accrue de ces formes réactives a lieu et les possibilités des systèmes de défense soit dépassées, un déséquilibre entre production et protection est entraîné, ce qui provoque un stress oxydatif (**Pasquier, 1995**). Le stress oxydatif peut conduire à des lésions inappropriées de tissus par l'oxydation de molécules, telles que les protéines et les lipides, constituants principaux des membranes cellulaires ; les protéines subissent des fragmentations et des agrégations, les lipides, des peroxydations conduisant à des liaisons lipides-protéines entraînant des dysfonctionnements des membranes cellulaires (**Sellak et al., 1992 ; Franzini et al., 1993**).

I. 3. Types d'inflammation

Plusieurs agressions tissulaires déclenchent une réaction inflammatoire aiguë, mais certaines lésions peuvent provoquer d'emblée une réaction inflammatoire chronique (ex : infection virales, réaction à corps étrangers, mycoses). Une inflammation aiguë peut disparaître ou aboutir à une cicatrisation, mais en absence d'une résolution elle peut évoluer vers une inflammation chronique (**Stevens et al., 2004**).

I. 3. 1. Inflammation aiguë

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles, si la destruction tissulaire est importante (**Charles et al., 2010**). L'inflammation aiguë repose sur trois phases principales en relation les uns avec les autres :

I. 3. 1.1. Phase vasculaire

La phase vasculaire consiste en une vasoconstriction artériolaire extrêmement brève, de quelques secondes, de type réflexe sous l'action du système nerveux sympathique. Elle est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine (**Weill et Batteux, 2003**). Ces médiateurs activent les plaquettes présentes dans la circulation, ce qui conduira à une vasodilatation des vaisseaux sanguins.

En conséquence, le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des protéines plasmatique et cellules sanguines vers les tissus (diapédèse). L'augmentation du débit microcirculatoire provoque l'apparition de chaleur, rougeur et d'œdème (**Kumar et al., 2007**).

L'altération des parois vasculaires va entraîner l'apparition de nouveaux récepteurs des cellules endothéliales comme ELAM-1, VCAM-1 et ICAM-1, ce qui va accentuer les phénomènes d'extravasation et de migration des cellules vers les tissus lésés. Ce phénomène est amplifié sous l'effet de la sécrétion de chimiokines par les cellules des parois vasculaires altérées (**Weill et Batteux, 2003**).

I. 3. 1. 2. Phase cellulaire

La phase cellulaire commence lorsque se trouvent rassemblés un grand nombre de polynucléaires, de macrophages et de plaquettes au site de l'inflammation ; les polynucléaires et les macrophages phagocytent les bactéries, les microcristaux et les débris de tissus nécrosés, phagocytose facilitée par les substances opsonisantes que sont les IgG et le C3b ayant des récepteurs sur la membrane de ces phagocytes (**Pasquier, 1995**).

Lors de la phagocytose, l'agent pathogène est internalisé par invagination de la membrane plasmique des polynucléaires, afin de former un phagosome. Les granules cytosoliques fusionnent à ce phagosome en déversant leur contenu hautement toxique dans le milieu intracellulaire forment ainsi ce qu'on appelle un phagolysosome ou dans le milieu extracellulaire lorsque l'agent pathogène possède une masse moléculaire élevée (**Klebanoff, 1992**).

Une fois le phagolysosome formé, il y a activation de nombreuses enzymes spécifiques, capables d'engendrer des radicaux libres délétères pour l'agent pathogène. Certaines enzymes (exemple : la NADPH oxydase) utilisent l'oxygène consommé en très grande quantité par les polynucléaires, afin d'élaborer des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxy (OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence de chlorure et de myéloperoxydase (MPO), le H_2O_2 est utilisé pour générer de l'acide hyperchloreux (HOCl) qui est un oxydant puissant utilisé par les polynucléaire pour léser les cellules selon un processus appelé flambée respiratoire oxydative (**Smith, 1994**). Les polynucléaires possèdent non seulement des granules cytoplasmiques contenant des

enzymes oxydatives, mais également des granules renfermant des enzymes hydrolytiques, protéolytique ainsi que des polypeptides antimicrobiens (**Borregaard et al., 1993**) Figure 1.

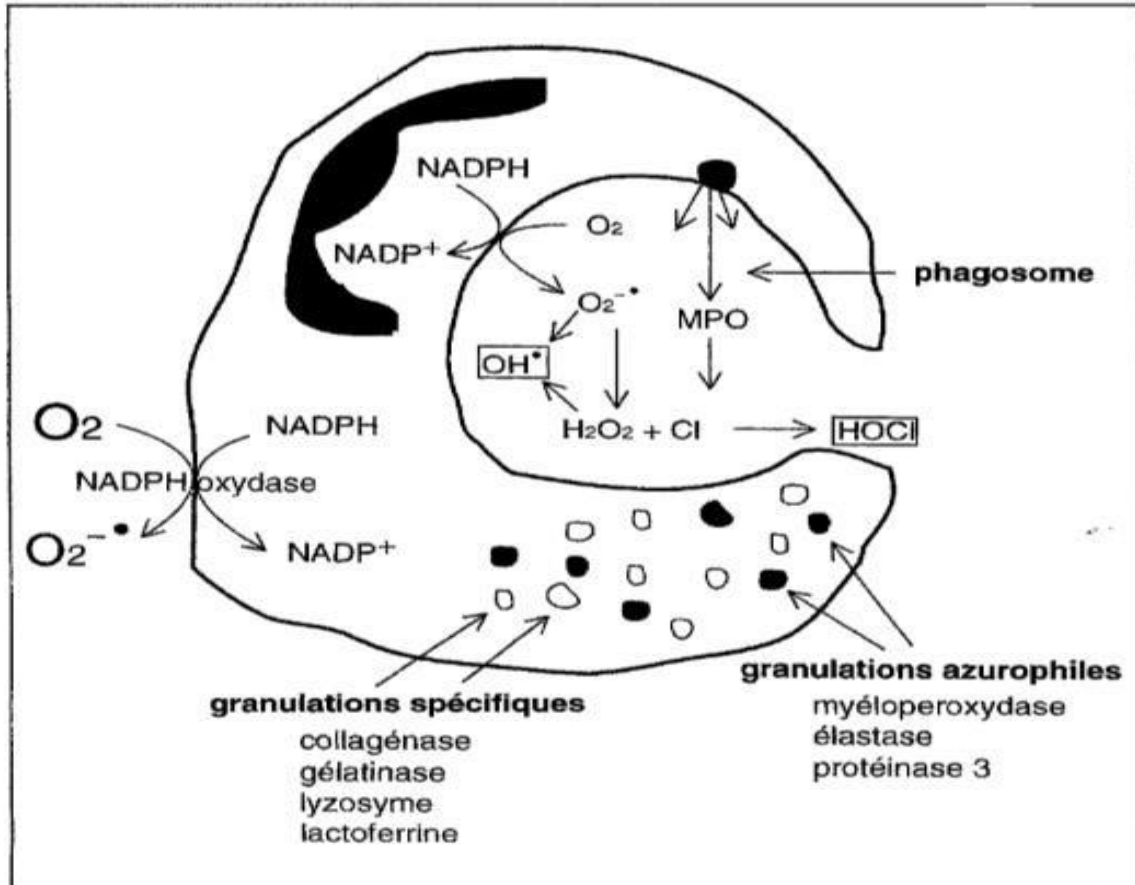


Figure 1 : Schéma représentant l'explosion oxydative chez les polynucléaires (**Pasquier, 1995**).

I. 3. 1. 3. Phase de résolution

La résolution de l'inflammation est à l'origine de la réparation tissulaire. Après un séjour de 24 à 48 heures, les neutrophiles s'engagent massivement vers la voie de l'apoptose, en réponse à divers signaux, notamment la diminution des messagers de survie (**Ward et al., 2002**). Les neutrophiles apoptotiques sont rapidement phagocytés par les macrophages, donnant à ces derniers un signal qui remplace leur synthèse de cytokines pro-inflammatoires par celle de cytokines anti-inflammatoires (**Fadok et al., 1998**). Il en découle que la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages, joue un rôle déterminant lors de la résolution de l'inflammation et de la réparation tissulaire (**Marsolais et Frenette, 2005**). Elle aboutit à une cicatrice si le tissu lésé ne peut régénérer ou lorsque la destruction tissulaire a été très importante et/ou prolongée. La réparation peut aboutir à une restitution

intégrale du tissu, il ne persiste alors plus aucune trace de l'agression initiale et de l'inflammation qui a suivi (Weill *et al.*, 2003).

I. 3. 2. Inflammation chronique

Ce sont des inflammations n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. L'inflammation chronique correspond à un échec de l'inflammation aiguë qui évoluent en inflammation chronique, lorsque la phase vasculo-exsudative est passée inaperçue, c'est souvent le cas de maladies auto-immunes (Seignalet, 2004 ; Rousselet *et al.*, 2005), quand l'agent pathogène initial persiste dans les tissus (détersion incomplète) ou bien lorsque la phase aiguë est récidive de façon répétée dans le même organe en entrainement à chaque épisode des destructions tissulaires mal réparées (Raynaud, 2008).

La persistance de l'inflammation serait responsable de séquelles anatomiques et fonctionnelles qui font la gravité des maladies inflammatoires chroniques (Seignalet, 2004 ; Raynaud, 2008).

I. 4. Anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments destinés à prévenir ou à contenir les manifestations inflammatoires. Ils sont utilisés lorsque la réaction inflammatoire est exagérée et chronique ou associée à des phénomènes immunologiques. Ils agissent sur la physiopathologie de l'inflammation, en atténuant ou supprimant des symptômes, sans agir sur leur étiologie (Dangoumau *et al.*, 2006).

I. 4. 1. Anti-inflammatoires synthétiques

Selon le mode d'action des anti-inflammatoires et l'origine de leurs biosynthèses, on distingue deux classes principales :

I. 4. 1. 1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont des acides faibles lipophiles et regroupent des molécules ayant, malgré une hétérogénéité structurale, un même mode d'action (Vaubourdolle, 2007). Les AINS forment un groupe de médicaments destinés à traiter la réaction inflammatoire et les maladies rhumatismales. Tous les AINS possèdent à des degrés divers les propriétés anti-inflammatoires ; analgésiques et antipyrétiques quelle que soit la

voie d'administration. Ils réduisent la vasodilatation, la perméabilité capillaire, mais aussi la migration des leucocytes et perturbent les réactions énergétiques nécessaires au processus inflammatoire (**Charpentier et al., 2004**).

Ils agissent tous en inhibant une enzyme membranaire, la cyclo- oxygénase (COX), diminuant ainsi la production des prostaglandines E2 et I2, médiateurs important des phénomènes inflammatoires (**Dangaoumau et al., 2006**).

Aussi ils agissent en inhibant la réaction inflammatoire par l'inactivation de la phospholipase membranaire, ils empêchent la libération de l'acide arachidonique précurseur des prostaglandines et ils induisent la formation d'une protéine appelée lipocortine qui se fixe sur la phospholipase et la rend inactive (**Hameed et al., 2008**).

I. 4. 1. 2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes

Les anti-inflammatoires stéroïdiens sont des dérivés des hormones stéroïdiennes de la corticosurrénale, principalement les glucocorticoïdes, qui sont biosynthétisés à partir du cholestérol et employés dans le domaine médical (**Wibowo et al., 2007**). Ils sont naturellement sécrétés par les glandes surénales, (**Muster, 2005**). Ils exercent leurs rôles anti inflammatoire selon deux voies majeurs :

Les glucocorticoïdes (GC) traversent librement les membranes cellulaires, dans le cytoplasme, ils se fixent sur un récepteur nucléaires spécifique aux stéroïdes (**Burmester et pezzutto, 2000**) ce complexe bloque l'inscription des gènes cibles (NF-kB, AP-1...) c'est par ce dernier mécanisme que les GC inhiberaient la production de la phospholipase A2 et de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α ...) (**Dangaoumau et al., 2006**).

I. 4. 2. Effets indésirables communs des anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont efficaces pour le traitement des symptômes de nombreuses maladies inflammatoires, mais leurs utilisations sont limitées en raison de leurs effets indésirables, qui influent sur le tractus gastro-intestinal (agressivité, ulcère et diminution de la résistance) et le système nerveux central SNC (**Lee et Feldman, 1997**). Le risque de lésions gastriques liées aux AINS est majeur au cours des trois premiers mois de traitement (**Capet et al., 2000**). Ils peuvent aussi entraîner une élévation de la pression artérielle que ce soit chez les sujets connus comme hypertendus ou non et donc, peuvent

conduire à l'initiation d'un traitement anti-hypertenseur (**Johnson et al., 1994 ; Griffin et al., 2001**). Ces effets secondaires aussi se traduisent par une insuffisance rénale aiguë comme la déshydratation, qui entraîne une déplétion volémique, et une altération préexistante de la fonction rénale (**Camu et al., 1996 ; Perez et al., 1996**). Les anti-inflammatoires peuvent être à l'origine d'hépatites médicamenteuses, l'utilisation prolongée ou régulière de ces médicaments majore le risque de néphrotoxicité (**Douce, 1998**). Les AINS peuvent aussi modifier l'action d'autres molécules, telles que les antidiabétiques oraux (sulfamides), dont l'action hypoglycémiant est potentialisée par les AINS (**Thomson, 1995**).

I. 4. 3. Anti-inflammatoires naturels

Face aux inconvénients et les risques que présentent les anti-inflammatoires (stéroïdien et non stéroïdien), il est nécessaire de disposer d'agents anti-inflammatoires avec moins d'effets secondaires et indésirables et l'un des candidats à la recherche en cours sont des constituants végétaux autrement appelés les anti-inflammatoires naturels. Quelques plantes à activité anti-inflammatoire sont résumées dans le tableau I.

Tableau I : Quelques plantes à activité anti-inflammatoire.

Plantes	Parties utilisées Ou molécules	Activités	Références
<i>Sideritis ozturkii</i> (Lamiaceae)	Parties aériennes Ozturkoside A Ozturkoside B Ozturkoside C	Propriétés anti-inflammatoires et gastroprotective	Kupeli et al., 2007
<i>Rosa canina</i> (Rosaceae)	Fruit	Anti-inflammatoires, contre la fièvre, désordres intestinaux et autres ...	Orhan et al., 2007
<i>Buddledja globosa</i> (Buddlejaceae)	Feuilles A et β amyryne	Activités analgésique antioxydant, anti-inflammatoire	Backhouse et al., 2008
<i>Uncaria tomentosa</i> (Rubiaceae)	Ecorces	Maladies gastriques, cancer, infection et inflammatoires	Aguilar et al., 2002
<i>Croton celtidifolius</i> (Euphorbiaceae)	Ecorces	Ulcère, leucémie, rhumatisme, et inflammation	Nardi et al., 2003
<i>Mallotus peltatus</i> (Euphorbiaceae)	Feuilles β -sitosterol	Infections et inflammations	Chattopadhyay et al., 2002
<i>Limoniastrum feei</i> (Plumbaginacea)	Feuilles	activités anti-inflammatoire	Rahmani et al., 2016

I. 5. *Pistacia lentiscus*

Parmi les plantes dotées d'activité anti-inflammatoire : *Pistacia lentiscus* qui est très utilisée pour ses propriétés médicinales

I. 5. 1. Description botanique

Le pistachier lentisque « *Pistacia lentiscus L.* », est un arbrisseau ramifié de trois mètres de hauteur, à odeur de résine fortement âcre de la famille des Anacardiaceae (Coste, 1937). Son fruit est une baie comestible, arrondie, d'environ cinq millimètres d'abord de couleur rouge, puis devient noire à maturité (More et White, 2005 ; Mezni *et al.*, 2012). Le pistachier lentisque « *Pistacia lentiscus L.* », couramment appelé « Darou » en arabe local (More et White, 2005) et nommé localement dans les régions kabyles « Amadagh ». Les graines sont communément appelées « Tidekth ».

I. 5. 2. Taxonomie

Le genre de *Pistacia* comporte plusieurs espèces : *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica*, *Pistacia chinensis*, *Pistacia integerrima*, *Pistacia mexicana*, *Pistacia terebinthes*. La taxonomie de l'espèce est démontrée dans le tableau II.

Tableau II : Taxonomie de *Pistacia lentiscus* (Ansari *et al.*, 2012).

règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyte
Classe	Dicotylédones
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>

I. 5. 3. Localisation géographique

Pistacia lentiscus est un arbrisseau que l'on trouve couramment en sites arides, Asie et région méditerranéenne de l'Europe et d'Afrique, jusqu'aux Canaries (Bellakhdar, 2003), en Algérie, elle est présente au niveau du tell et dans les zones

forestières (Delille, 2007). C'est une espèce qui pousse dans tout type de sol, mais préfère les terrains siliceux (Castola *et al.*, 2012).

I. 5. 4. Utilisations traditionnelles

Pistacia lentiscus est connu pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. En effet, la décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (Palevitch et Yaniv, 2000). Les médecines traditionnelles pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, l'hypertension (grâce à ses propriétés diurétiques) (Scherrer *et al.*, 2005), la toux, les maux de gorge, l'eczéma, des calculs rénaux et la jaunisse (Gardeli *et al.*, 2008).

Les graines peuvent être préparées en les faisant bouillir ou grillées avec du blé concassé, aspergées d'huile d'olive, utilisées dans les régions Est de l'Algérie (Chryssavgi *et al.*, 2007 ; Delille, 2007).

Les huiles du lentisque sont souvent utilisées comme un remède d'application externe locale sous forme d'onguent pour soigner les brûlures ou les douleurs dorsales (Bellakhdar, 1997). Mais aussi connues pour leurs vertus thérapeutiques en ce qui concerne les problèmes lymphatiques et circulatoires (Prichard, 2004).

Les feuilles sont également utilisées dans le traitement l'eczéma, infections buccales, diarrhées, jaunisse, maux de tête, asthme et problèmes respiratoires (Villar *et al.*, 1987 ; AliShtayeh *et al.*, 1998 ; Ali-Shtayeh *et al.*, 2000 ; Lev et Amar, 2002).

Le mastic est souvent cité comme un remède efficace contre certaines maladies telles que l'asthme, les diarrhées, les infections bactériennes, les ulcères gastriques et comme un agent antiseptique du système respiratoire (Al-Said *et al.*, 1986 ; Huwez et Al- Habbal, 1986 ; Yasilada *et al.*, 1995 ; Marone *et al.*, 2001).

I. 5.5. Composition chimique de *Pistacia lentiscus*

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. La plante est réputée par ses huiles essentielles, fixes et grasses (Charef *et*

al., 2008), elle contient aussi des tannins (Nahida *et al.*, 2012), ainsi que des flavonoïdes glycosylés (Vaya et Mahmood, 2006), des anthocyanes (Longo *et al.*, 2007), une résine (leonti *et al.*, 2001), et des triterpènes (Monaco *et al.*, 1982).

Selon Longo et ses collaborateurs (2007), les fruits de *Pistacia lentiscus* contiennent 5,4mg/ml d'anthocyanines, essentiellement : cyanidine 3-O-glucoside (70%), delphinidine 3-O-glucoside (20%) et cyanidine 3-O-arabinoside (10%). Par ailleurs, une autre étude chimique effectuée sur la fraction d'acétate d'éthyle (AcOEt) de fruits de *Pistacia lentiscus* a permis d'isoler deux polyphénols : acide gallique et 1.2.3.4.6- pentagalloylylucose (Abdelwahed *et al.*, 2007). Les structures chimiques des polyphénols et les composés phénolique de fruit de *Pistacia lentiscus* sont représentés en annexe 1 et 2 respectivement.

L'huile fixe représente 38,8 % du poids des fruits, elle contient 53 % d'acide gras monoinsaturé. Le principal acide gras est l'acide oléique (50 -72%), suivie de l'acide palmitique (23,2%) et l'acide linoléique (21,7%), les autres acides gras sont retrouvés en faible quantités [acide palmitoléique (1.3%), stéarique (1.1%), linoléique (0.8%), gadoléique (0.2%) et arachidique (trace)]. Quatre stérols ont été trouvés dans l'huile fixe, le β -sitostérol (90%), le camestérol, le cholestérol et le stigmastérol (Trabelsi *et al.*, 2011).

Par ailleurs, les travaux réalisés par Hamad et ses collaborateurs (2011) ont montré que les protéines représentent 5% du poids des fruits de *Pistacia lentiscus*. Tandis que La composition minérale de ces fruits montre que la teneur en potassium est la plus élevée (2,67%), alors que celles du sodium, calcium et phosphore sont de : 0,46, 0,37 et 0,004 % respectivement.

La composition chimique des feuilles de *Pistacia lentiscus* est caractérisée par la présence de glycosides de flavonoles comme la quercétine, myricétine, luteoline ainsi que l'isoflavone genisteine (Romani *et al.*, 2002 ; Stocker *et al.*, 2004 ; Vaya et Mahmood, 2006). Elles contiennent 6 à 7% du 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 L'huile essentielle, de sa part, représente 0,14- 0,17% du poids des feuilles de *Pistacia lentiscus* (Romani *et al.*, 2002).

I. 5. 6. Activités biologiques de *Pistacia lentiscus*

L'évaluation des activités biologiques potentielles de *Pistacia lentiscus* a fait l'objet de plusieurs études scientifiques, qui ont démontré son efficacité thérapeutique, grâce à ses composés actifs, notamment les activités neuro-protective, antibactérienne et antimicrobienne, analgésique, anti hépatotoxique, antiathérogène, antioxydant et l'activité antiproliférative dans le cancer du côlon sans compter son efficacité contre l'ulcère d'estomac, en éliminant la bactérie *Helicobacter pylori* (Ansari *et al.*, 1996 ; Iauk *et al.*, 1996 ; Janakate *et al.*, 2002 ; Lev *et al.*, 2002; Dedoussi *et al.*, 2004 ; Balan *et al.*, 2007 ; Mansouri *et al.*, 2013 ; Remila *et al.*, 2015).

D'une autre part, des études, *in vivo*, *et in vitro*, ont été réalisées sur *Pistacia lentiscus* qui révèlent son pouvoir anti-inflammatoire (Giner-Larza *et al.*, 2001 ; Maxia *et al.*, 2001 ; Gardeli *et al.*, 2008 ; Remila *et al.*, 2015), notamment l'inflammation intestinale et la goutte (Al-said *et al.*, 1986).

I. 7. Méthodes d'évaluation des agents anti-inflammatoires

Des conditions inflammatoires aiguës peuvent être produites chez des animaux de laboratoire en utilisant divers agents phlogistiques. La principale difficulté concerne les maladies inflammatoires chroniques, qui incluent un grand nombre de maladies et de syndromes, causés par un ou plusieurs facteurs inconnus. Les études, *in vitro*, peuvent éclairer le mode d'action des agents anti-inflammatoire au niveau moléculaire. Ces études sont souvent réalisées dans un système d'organes isolé, ou des préparations cellulaires ou subcellulaires avec une idée que ces deux préparations sont sensibles aux médicaments et conservent suffisamment les caractéristiques requises qui soutiennent les processus de la maladie en cours (Naik *et al.*, 1976). Quelques méthodes d'études de l'activité antiinflammatoires *in vivo*, *et in vitro*, sont résumées en annexe 2.

Parmi ces protocoles, la méthode de stabilisation de la membrane du globule rouge, qui est considérée comme modèle d'étude du mécanisme d'action de l'activité antiinflammatoire par la stabilisation de la membrane lysosomale, afin de limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosomaux.

I. 8. Globule rouge

Le globule rouge (GR) ou hématie ou encore érythrocyte est une cellule mature formée dans la moelle osseuse, anucléée, qui est schématiquement représenté comme un sac contenant des enzymes et de l'hémoglobine. Le GR possède la forme d'une lentille biconcave dont le diamètre est de 7 à 8 μm . Le GR est la cellule sanguine la plus abondante (Stevens et Lowe, 1997 ; Valensi, 2005).

I. 8. 1. Structure du globule rouge

La structure du GR se décompose schématiquement en trois éléments : la membrane, les enzymes et l'hémoglobine. La membrane du globule rouge comporte : la membrane cytoplasmique et le cytosquelette membranaire.

I. 8. 1. 1. Membrane du globule rouge

Sa structure est celle d'une membrane cellulaire classique elle est constituée d'une bicouche lipidique où s'intercalent des protéines. Certaines protéines sont des transporteurs d'ions, d'autres sont des récepteurs membranaires. Une partie de ces protéines est porteuse des fonctions antigéniques du globule rouge et des groupes sanguins érythrocytaires (ABO, Rhésus, etc...) (Sébahoun, 2005).

I. 8. 1. 2. Squelette membranaire du globule rouge

Responsable de propriétés mécaniques du globule rouge, il est formé d'un réseau de protéines qui tapissent la face interne de la membrane cytoplasmique de GR. Le principal constituant protéique de ce réseau est la spectrine (Haest, 1982).

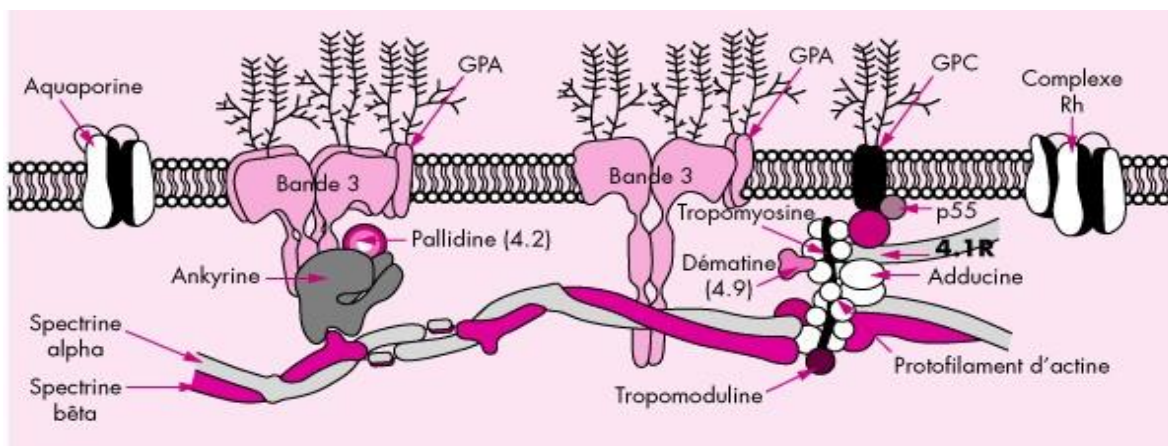


Figure 2 : schéma de la membrane érythrocytaire (Delaunay, 2007).

I. 8. 1. 3. Enzymes érythrocytaires

En raison de la perte du noyau, des mitochondries et des ribosomes, les érythrocytes matures sont incapables d'effectuer la phosphorylation oxydative et la synthèse des protéines. Cependant, ils doivent encore maintenir un métabolisme actif pour maintenir la flexibilité et l'intégrité de la membrane des globules rouges, ainsi que pour préserver l'hémoglobine sous sa forme fonctionnelle afin d'assurer une distribution d'oxygène similaire. Les enzymes des globules rouges permettent aux érythrocytes de respecter ces tâches en soutenant deux voies métaboliques importantes : la glycolyse et pentose phosphate. D'autres enzymes érythrocytaires, par exemple pyrimidine 5 nucleotidase, participent à la dégradation et au sauvetage des nucléotides et sont essentiels à l'élimination des précurseurs nucléotidiques qui peuvent être toxiques pour les érythrocytes (**Prchal et Gregg, 2005**).

I. 8. 1. 4. Hémoglobine

Principale constituant du globule rouge, l'hémoglobine (Hb) est une chromoprotéine contenant du Fer, assure l'oxygénation tissulaire elle est formée de : 4 chaînes de globine et 4 molécules de l'hème (**wajcman, 2005**).

I. 9. Mécanisme d'hémolyse induit chez les érythrocytes :

Les principales fonctions des érythrocytes sont le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone et l'élimination des protons formés lors du métabolisme tissulaire. De manière connexe, les canaux anioniques transfèrent des acides et des équivalents de base dans leurs membranes en tant que divertissement d'échange équimolaire d'anions, principalement Cl^- , HCO_3^- et OH^- (**Wood et Lenfant., 1987**). Dans un milieu acide, le Cl^- externe est échangé avec HCO_3^- interne ou OH^- et les érythrocytes gonflent osmotiquement.

Ce dernier est dû à la libération d'ions alcalins liés à l'hémoglobine en échange de protons (**Ilani et Granoth, 1990**). La désoxygénation de l'hémoglobine et son oxydation à la méthémoglobine peuvent générer des radicaux oxygénés qui sont normalement éliminés par le système antioxydant intrinsèque des érythrocytes. Les oxyradicals, à leur tour, provoquent une attaque oxydante sur les membranes et cause l'hémolyse (**Gross et al., 1996**).

La peroxydation lipidique nécessite un certain temps pour briser la membrane des érythrocytes. Les globules rouges dans les solutions hypotoniques subissent un changement

morphologique en fonction des cations et des anions présents dans les solutions salines. Les globules rouges lorsqu'ils sont gonflés dans le KCl hypotonique, favorisent l'ouverture des canaux K^+ sensibles au volume indépendants de la tension et un afflux supplémentaire des ions K^+ entre dans ces cellules. De plus une interaction entre le chlorure et les canaux de potassium sensibles au volume entraîne une plus grande quantité d'afflux de la solution, L'entrée des ions K^+ traîne les molécules d'eau dans les globules rouges ce qui provoque une fragilité et une hémolyse précoce (**Kaji et Amblard, 1986**).

La synthèse d'ATP par les érythrocytes est inhibée au pH acide et la concentration en ATP diminue pendant le stockage des globules rouges, car l'ATP continue d'être consommée pour maintenir la fonction et la survie des globules rouges. Le maintien d'une concentration élevée d'ATP est essentiel pour préserver l'asymétrie de la membrane des globules rouges et les pompes à canaux ioniques, de ce fait la réduction de la concentration d'ATP entraîne l'hémolyse des globules rouges (**Hess, 2006**).

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits ethanologique et aqueux du fruit de *Pistacia lentiscus*, par la méthode de stabilisation membranaire en utilisant les globules rouges humains (GRh), ainsi qu'un test complémentaire concernant l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis, de l'ABTS^{o+} et du DPPH°.

Matériel
&
Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Extraits ethanologique et aqueux du fruit de *Pistacia lentiscus*

Les fruits de *Pistacia lentiscus* (Figure 3) ont été récoltés en mois de novembre 2015, dans un endroit naturel loin de toute pollution au niveau de la région de Berbacha de la ville de Bejaia,



Figure 3 : Photographie des feuilles (a), graines (b) et écorces des racines (c) de *P.lentiscus* (Berbacha, Béjaia).

Les graines de *Pistacia lentiscus* ont été séchées dans un endroit aéré à l'abri de la lumière et à température ambiante. Par la suite, cette partie de plante a fait l'objet d'un broyage, jusqu'à l'obtention d'une pâte visqueuse de couleur pourpre.

Une quantité de cette pâte huileuse (100 g) a été d'abord dilipidée par une extraction à l'hexane (400 mL), sous agitation pendant 24h, afin d'éliminer les lipides contenus dans l'échantillon. La pâte récupérée a été pesée et divisée en deux quantités. Une partie a subi une macération avec de l'éthanol (1/4, p/v), sous agitation, pendant 24h. Après décantation, le surnageant a été récupéré et séché au rotavapeur. Tandis que la deuxième partie a été mélangée avec de l'eau distillée (1/4, p/v), à température ambiante, pendant 24 h, sous agitation. Après décantation du mélange, le surnageant est filtrée sur papier Wattman. Ce filtrat est ensuite réduit en extrait sec par lyophilisation.

II.1.2. Echantillons de sang humain

Des échantillons de sang frais (environ 6 mL) ont été récupérés dans des tubes héparinisés, au niveau du laboratoire d'analyse 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. Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh)

✓ Mode opératoire

Les différents échantillons de sang humain récupérés sont centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min, afin d'éliminer le plasma et les cellules polynucléaires. Ensuite, le culot de globules rouges est lavé trois fois, avec un volume équitable de solution iso-saline. Après cette étape, le volume a été mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 % (v/v) (GRh), avec une solution iso-saline et utilisé immédiatement (**Sadique et al., 1989**).

II.2.2 Test de cytotoxicité des extraits ethanologique et aqueux du fruit de *Pistacia lentiscus*

Avant d'entreprendre le test de l'activité anti-hémolytique des extraits du fruit de *Pistacia lentiscus*, un test de toxicité est nécessaire, afin de cibler les concentrations à utiliser.

✓ Principe

Le principe de ce test est de mettre en contact des hématies avec les extraits ethanologique et aqueux du fruit de *P. lentiscus*, à différentes concentrations (80-1600 µg/mL), dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces extraits, vis-à-vis, des GRh.

✓ Mode opératoire

Le protocole suivi est celui de **Bulmus et ses collaborateurs (2003)**, où un volume de 1,6 mL de l'extrait ethanologique ou aqueux du fruit de *P. lentiscus* et l'acide gallique, molécule de référence de composés phénoliques, rapportée à forte concentrations dans les extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus*, que ça soit sous sa forme libre ou liée (tannins hydrolysables) (**Romani et al., 2002**), a été mélangé avec un volume de 0,4 mL de la suspension de GRh (10%). Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C, pendant 30 min, ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min et l'absorbance de l'hémoglobine libérée a été mesuré à 560 nm. En parallèle, deux contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions, en

remplaçant l'extrait avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec de l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100 % d'hémolyse). Six répliques correspondant à six volontaires différents ont été réalisées pour chaque concentration.

✓ Expression des résultats

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \left(\frac{At}{Ac} \right) \times 100$$

Où :

Ac = Absorbance du contrôle.

At = Absorbance du test

II.2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits ethanologique et aqueux des fruits de *Pistacia lentiscus* par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges

✓ Principe

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits ethanologique et aqueux du fruit de *Pistacia lentiscus* à empêcher l'hémolyse des GRh, induite par l'hypotonie et la chaleur et donc prévenir la libération de l'hémoglobine. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par (Sadique *et al.*, 1989 ; oyedapo *et al.*, 2004).

✓ Mode opératoire

Le milieu réactionnel contenant 0,5 mL de l'extrait, du Diclofénac sodique ou l'acide gallique à différentes concentrations (10-300 µg/mL), mélangé avec 1,5mL du tampon phosphate (0,9% NaCl, pH=7,4) et 2ml d'une solution hypo-saline (0,36 % NaCl), a été incubé à 37°C pendant 20 min. ensuite 0,5 mL de la suspension de GRh (10%) ont été ajoutés à chaque concentration et une deuxième incubation a été réalisée à 56°C pendant 1h. Au final, les tubes ont été refroidit sous l'eau courante et suivie par une centrifugation à 2500

rpm pendant 5min et les absorbances du surnageant ont été mesurées à 560 nm. En parallèle un contrôle a été réalisé en remplaçant l'extrait avec 0,5 mL du tampon phosphate.

✓ Expression des résultats

Le pourcentage de stabilité membranaire a été estimé à partir de l'expression suivante :

$$\% \text{ de stabilité membranaire} = \left(\frac{A_c - A_t}{A_c} \right) \times 100$$

Où :

A_c = Absorbance du contrôle.

A_t = Absorbance du test.

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits ethanolique et aqueux du fruit de *Pistacia lentiscus*

II.2.4.1. Activité anti-radicalaire du DPPH°

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α, α -diphényl β picrylhydrazyle DPPH°) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier l'activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. (BrandWilliams *et al.*, 1995).

✓ Principe

La réduction du radical libre DPPH° par un antioxydant peut être suivie par Spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH° de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006). (Figure. 4)

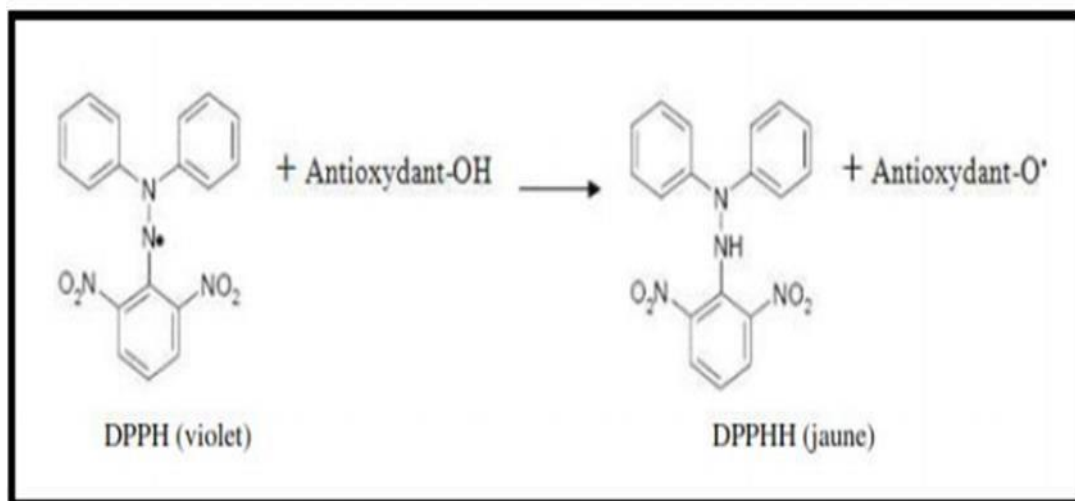


Figure 4 : Réaction de test DPPH° (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Congo, 2012).

✓ Mode opératoire

L'activité scavenger du radical DPPH° a été mesurée selon le protocole décrit par **Wu et ses collaborateurs (2005)**. Une solution du DPPH° (0,1 mM) a été préparée avec du méthanol, ensuite 180 µL de cette solution a été mélangé avec 20 µL d'une solution méthanolique des extraits ethanoliqes et aqueux du fruit de *P. lentiscus* à différentes concentrations (1-40 µg/mL). Parallèlement, un contrôle a été préparé en mélangeant 20 µL du méthanol avec 180 µL de la solution méthanolique de DPPH°. La lecture de l'absorbance a été faite contre un blanc (200µL du méthanol) à 517nm, après 30 min d'incubation à l'obscurité et à 30°C.

Le contrôle positif a été représenté par une solution de quelques molécules de composés phénoliques purs (Baicalin, Acide galique et Quercitine), dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test a été répété 3 fois.

✓ Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = \left(\frac{A_c - A_t}{A_c} \right) \times 100$$

Où :

Ac = Absorbance du contrôle.

At = Absorbance du test.

II.2.4.2. Activité anti-radicalaire de l'ABTS^{°+}

Le composé chimique acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) est utilisé comme moyen pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits étudiés, l'addition d'antioxydants au cation radical effectué le réduit en ABTS° (**Re et al., 1999**).

✓ Principe

La méthode de radicale ABTS^{°+} se base sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 - éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide) (ABTS^{°+}).



Cette réaction est suivie par spectrophotométrie par la variation de spectre d'absorption (**Jiri et al., 2010**).

✓ Mode opératoire

Le protocole utilisé est celui de **Lien et ses collaborateurs (1999)**. Le radical ABTS^{°+} a été généré en mélangeant une solution d'ABTS (7mM) avec 2,45mM de persulfate de potassium (K₂S₂O₈). Le mélange a été incubé à l'abri de la lumière et à température ambiante durant 16 h avant utilisation. Ensuite, cette solution stock a été diluée avec de l'éthanol pour avoir une absorbance finale de 0,7 ±0,05, à 734 nm.

Un volume de 180 μL de la solution d'ABTS^{o+} a été mélangé avec 20 μL de l'extrait des fruits de *Pistacia lentiscus* à différentes concentrations (1-40 μl) et après 6 min d'incubation à 30°C, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur microplaque, à 734 contre un blanc (200 μL de méthanol).

L'acide galique, baicalin, et quercétine ont été utilisés comme molécules de références de composés phénoliques et pour chaque concentration le test a été répété 3 fois.

✓ Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{o+} a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'ABTS}^{\text{o+}} = \left(\frac{Ac - At}{Ac} \right) \times 100$$

Où :

Ac = Absorbance du contrôle.

At = Absorbance du test.

II.2.5. Evaluation statistique des résultats

Tous les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'erreur standard de la moyenne (M \pm S.E.M) (n=4) pour les tests de toxicité et stabilité membranaire du globule rouge et en moyenne \pm écartype (n=3) pour les tests antioxydant

L'analyse statistique a été effectuée, en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.03, par l'analyse de la variance (ANOVA), suivi du test de Dunnett's et tuckey. Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées significatives.

Résultats
&
Discussion

III. 1. Résultats

III. 1. 1. Test de cytotoxicité

Le test de cytotoxicité, *in vitro*, a été réalisé en utilisant des globules rouges humains (GRh). Différentes concentrations des extraits ethanolique et aqueux de graines de *Pistacia lentiscus* ainsi qu'une molécule de référence, l'acide gallique, ont été testés. Le pourcentage de l'hémolyse a été évalué pour chaque extrait, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine échappée des globules rouges, en comparaison à des contrôles à savoir le contrôle négatif (C-) : solution de GR dans de l'eau physiologique, et le contrôle positif (ED) en remplaçant l'eau physiologique avec de l'eau distillée afin de provoquer une hémolyse totale (100% d'hémolyse).

Les résultats obtenus sont représentés dans les graphes suivants :

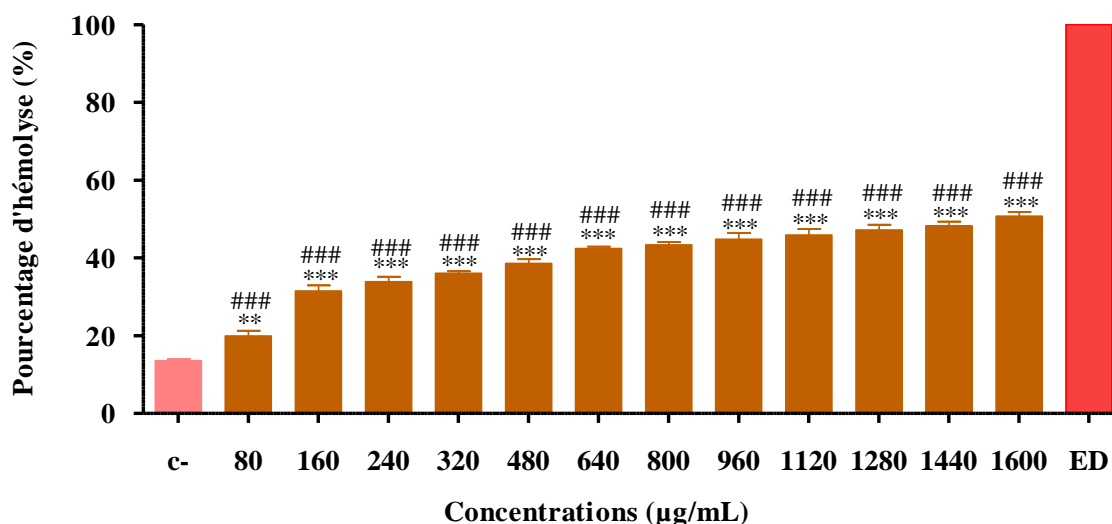


Figure 5 : Effet de l'acide gallique sur l'hémolyse des globules rouges. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 comparé au contrôle négatif et #p<0,05 comparé au contrôle positif. One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

D'après les résultats, on note que l'acide gallique représente un effet hémolytique en comparaison avec le contrôle négatif (C-), à la concentration 80µg/mL, avec un pourcentage de cytotoxicité de 19.98%. Cet effet hémolytique atteint 50.72 % à la concentration 1600 µg/mL.

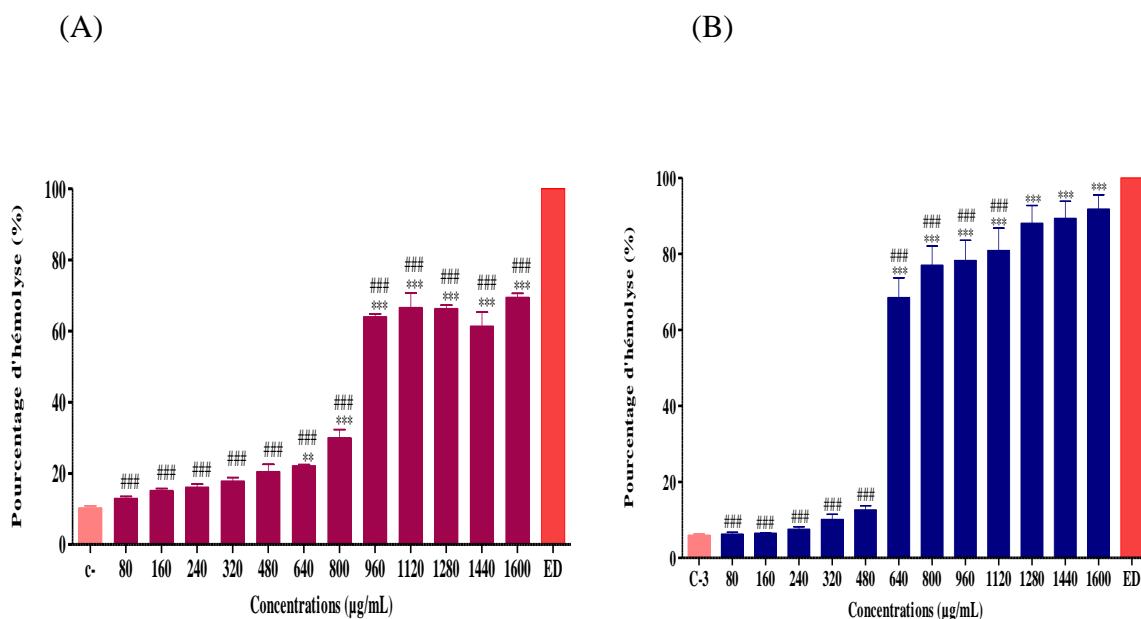


Figure 6 : Pourcentage d'hémolyse de l'extrait aqueux des graines de *Pistacia lentiscus* (A) et l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* (B). Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 comparé au contrôle négatif et #p<0,05 comparé au contrôle positif. One-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

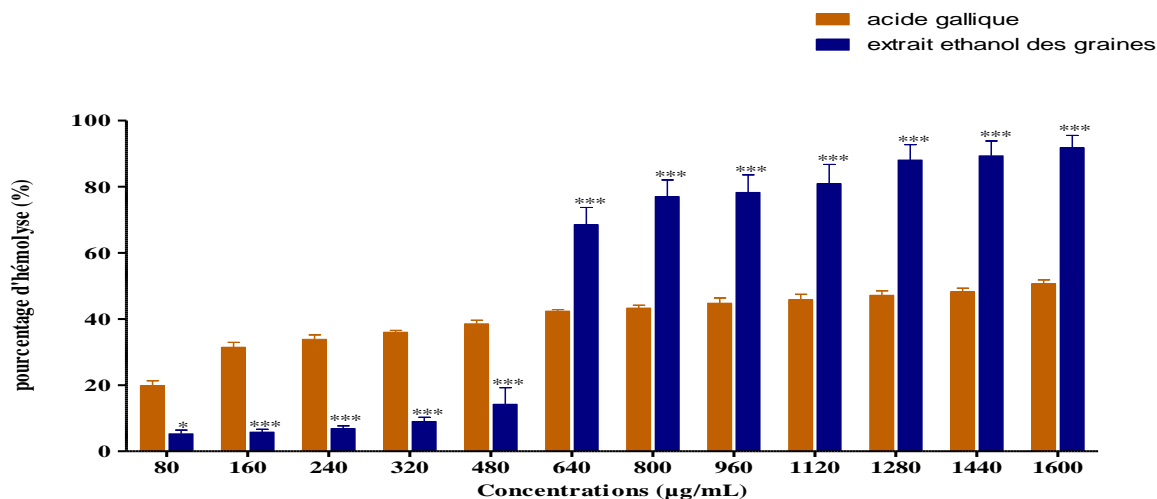
Comparativement au contrôle négatif (C-), l'extrait aqueux des graines de *Pistacia lentiscus* ne représente aucun effet cytotoxique à faibles concentrations (de la concentration de 80µg/mL jusqu'à 480µg/mL) avec un pourcentage d'hémolyse au environ de 15%. Une différence significative a été observée (P<0,01) à 640 µg/mL avec un pourcentage de cytotoxicité de 22.08 %, ce qui signifie que la cytotoxicité de cet extrait commence à cette concentration. Au-delà de cette concentration le pourcentage d'hémolyse des GR est important voir 65 %.

De même, l'extrait éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* ne présente aucun effet cytotoxique à faibles concentrations, avec un pourcentage d'hémolyse qui ne dépasse pas 10 %. Par contre, on constate un effet significatif (P<0,001) à partir de la concentration 640 µg/mL.

Les concentrations supérieures à 1200 µg/mL, représentent un effet très cytotoxique comparable à celui provoqué par l'eau distillée (100% d'hémolyse).

D'une autre part, le comportement des deux extraits aqueux et ethanolique des fruits de *P. lentiscus* a été comparé à la molécule de référence de composés phénoliques, l'acide gallique (figure 7).

(A)



(B)

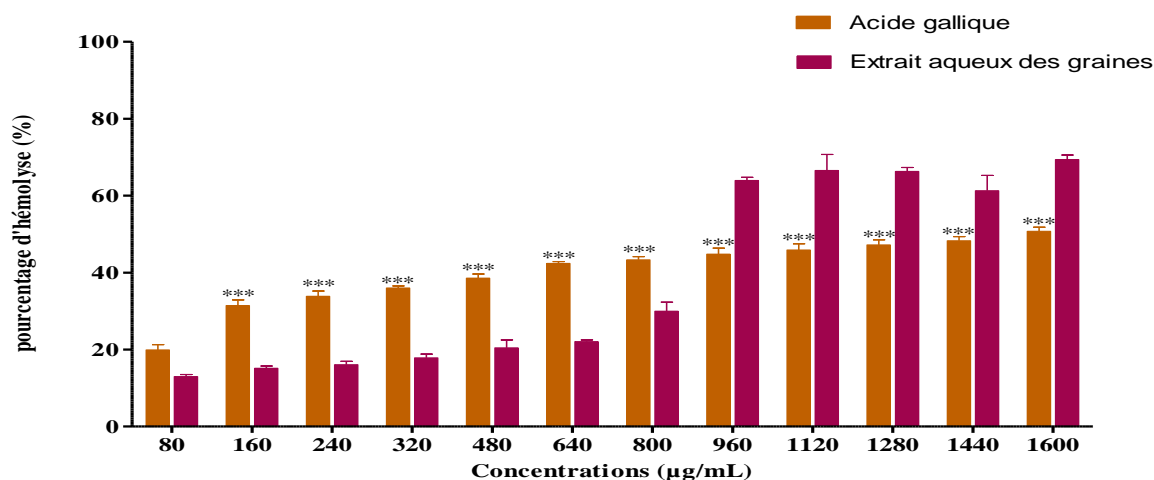


Figure 7 : Comparaison entre le pourcentage d'hémolyse (%) de l'extrait ethanolique des graines de *P. lentiscus* (B) et de l'extrait aqueux des graines de *P. lentiscus* (A) avec l'acide gallique. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 comparaison par rapport à la même concentration. Two-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

On remarque clairement que l'effet hémolytique de l'acide gallique est plus prononcé que l'extrait aqueux des fruits de *P. lentiscus* aux concentrations inférieures à 800 µg/mL, par contre à fortes concentrations supérieures à 960 µg/mL, l'extrait aqueux se révèle plus cytotoxique que l'acide gallique.

Par ailleurs, l'extrait éthanolique des fruits de *P. lentiscus* exhibe sa cytotoxicité à des concentrations supérieures à 640 $\mu\text{g/mL}$, avec des pourcentages dépassant ceux révélés par l'acide gallique.

La comparaison entre l'effet hémolytique de deux extraits a été effectuée (Figure 8).

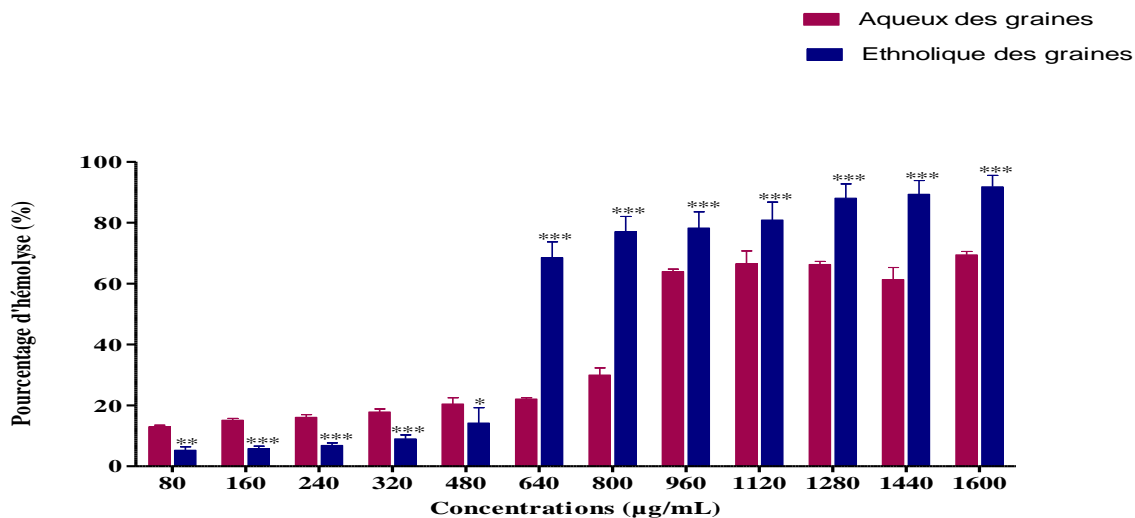


Figure 8 : Comparaison entre le pourcentage d'hémolyse (%) de l'extrait éthanolique et aqueux des graines de *Pistacia lentiscus*. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 comparaison par rapport à la même concentration. Two-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

D'après les résultats, on note que l'extrait aqueux des graines présente des effets hémolytiques du globule rouge supérieurs à ceux démontrés par l'extrait éthanolique à faibles concentrations (de la concentration 80 $\mu\text{g/mL}$ jusqu'à 480 $\mu\text{g/mL}$), par contre l'extrait éthanolique s'est révélé plus cytotoxique à fortes concentrations (de la concentration 640 $\mu\text{g/mL}$ jusqu'à 1600 $\mu\text{g/mL}$), avec un taux d'hémolyse nettement supérieur à 60%.

III. 1. 2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits éthanolique et aqueux des fruits de *Pistacia lentiscus* par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges

L'étude de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits éthanolique et aqueux de graines de *Pistacia lentiscus* a été réalisée, en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains (GRh). L'évaluation de la stabilisation membranaire a été déterminée par la mesure de la libération d'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration des deux extraits et en les comparant à des molécules de référence ; le diclofinac sodique comme étant un médicament anti-inflammatoire et l'acide gallique, composé majoritaire présent dans les graines de *Pistacia lentiscus*. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures ci-dessous :

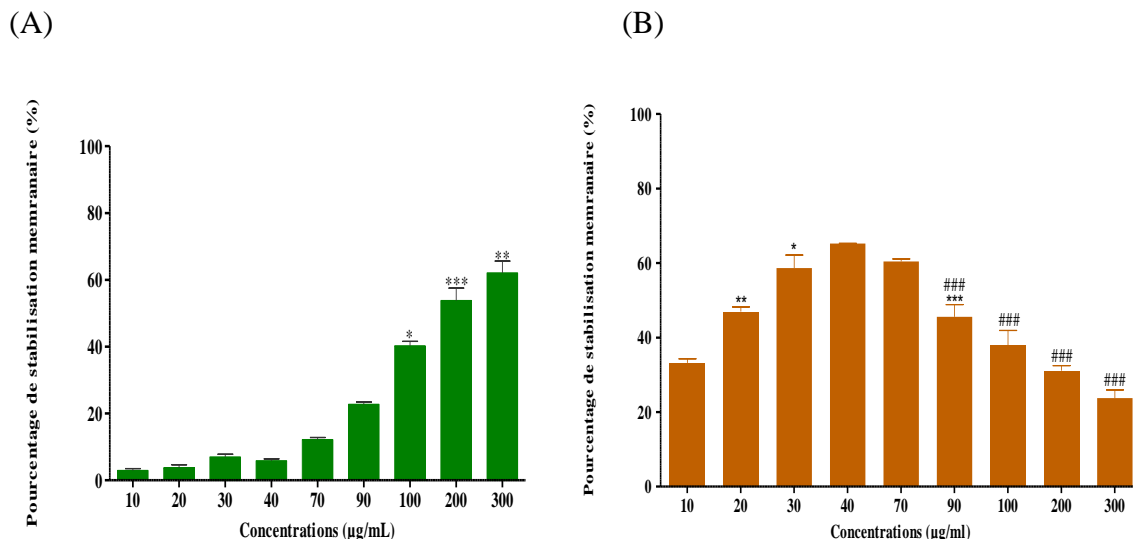


Figure 9 : Effet du diclofinac (A) et l’acide gallique (B) sur l’inhibition de l’hémolyse des globules rouges humains (GRh) induit par l’hypotonie (0,3% NaCl) et la chaleur (1h incubation à 56°C). Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (n=4). *P<0.05 comparé à la concentration précédente et #p<0,05 comparé au seuil. Two-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l’analyse statistique.

D’après ces résultats, on remarque que le diclofinac à faible concentration (< à 70 µg/mL) n’a pas d’effet stabilisateur de la membrane des érythrocytes. L’activité augmente significativement à partir de 100 µg/mL où les pourcentages de protection sont de 53,81%.

Par ailleurs, l’acide gallique, à faible concentration présente un effet protecteur significatif et atteint son maximum à 30 µg/mL (58,65%), cette activité diminue significativement à partir de 90µg/mL.

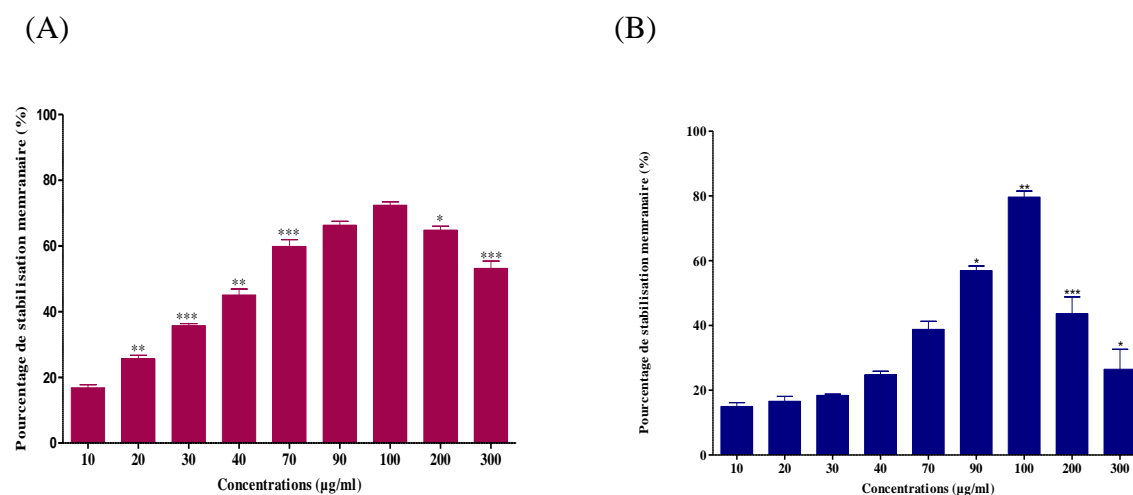


Figure 10 : Effet de l’extrait aqueux (A) et de l’extrait éthanolique (B) sur l’inhibition de l’hémolyses des globules rouges humaines (hRBC) induit par l’hypotonie (0,3% NaCl) et la chaleur (1h incubation à 56°C). Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (n=4). *P<0.05 comparé à la

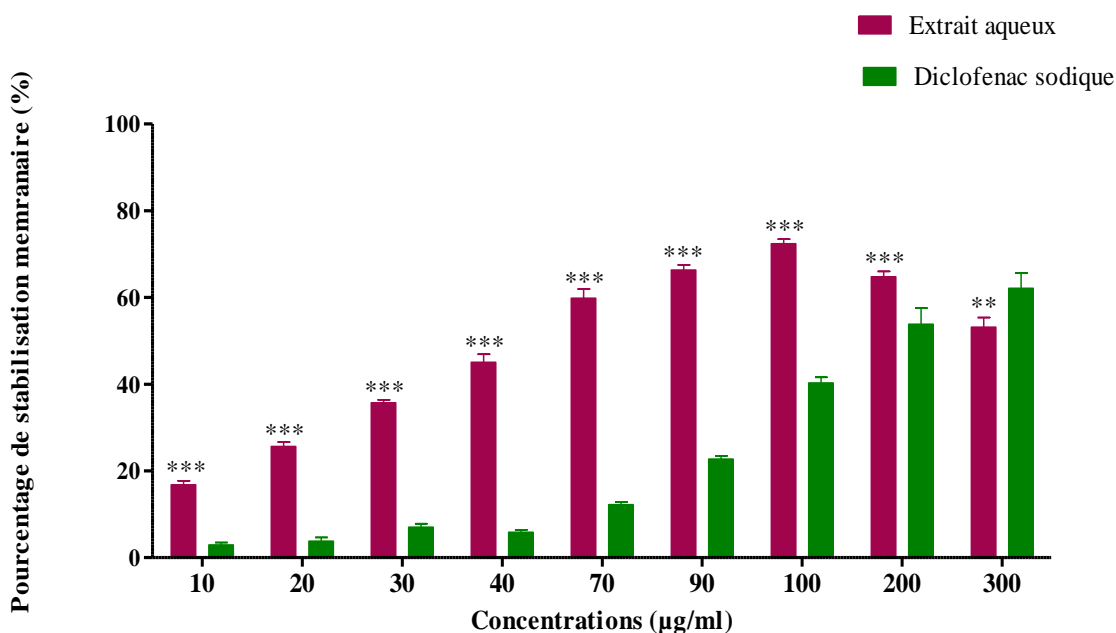
concentration précédente et # $p < 0,05$ comparé au seuil. Two-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

Les données de l'extrait aqueux des graines de *Pistacia lentiscus* indiquent qu'il présente une activité significative à faible concentration (à partir de 20 $\mu\text{g/ml}$). Cette activité stabilisatrice de la membrane des globules rouges continue d'évoluer avec l'augmentation de la concentration et un maximum de protection a été enregistré à une concentration de 70 $\mu\text{g/mL}$ (59,84% de protection). Par contre à forte concentration (300 $\mu\text{g/mL}$), l'activité protectrice diminue significativement en comparaison avec l'effet optimum observé aux concentrations qui précèdent.

L'extrait ethanologique des graines de *Pistacia lentiscus* a montré une activité minimale à faible concentration et une forte activité à 100 $\mu\text{g/mL}$ avec un pourcentage de stabilisation 79,65%. Par la suite, l'activité anti-hémolytique diminue significativement jusqu'elle atteint 25,51% à 300 $\mu\text{g/mL}$.

L'effet anti-hémolytique de l'extrait aqueux a été comparé à celui de l'acide gallique et Diclofénac sodique. Les résultats obtenus sont présentés dans les graphes suivants :

(A)



(B)

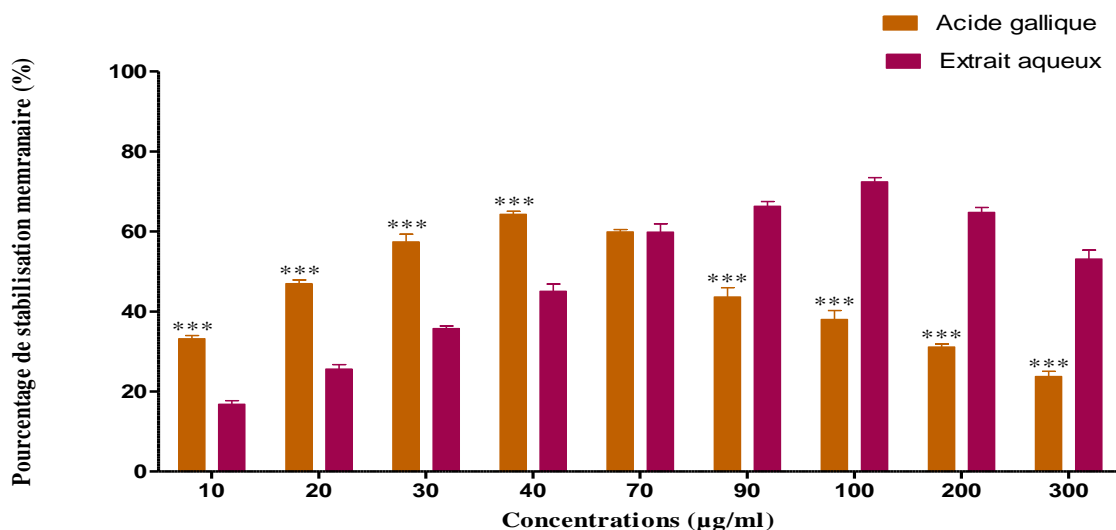


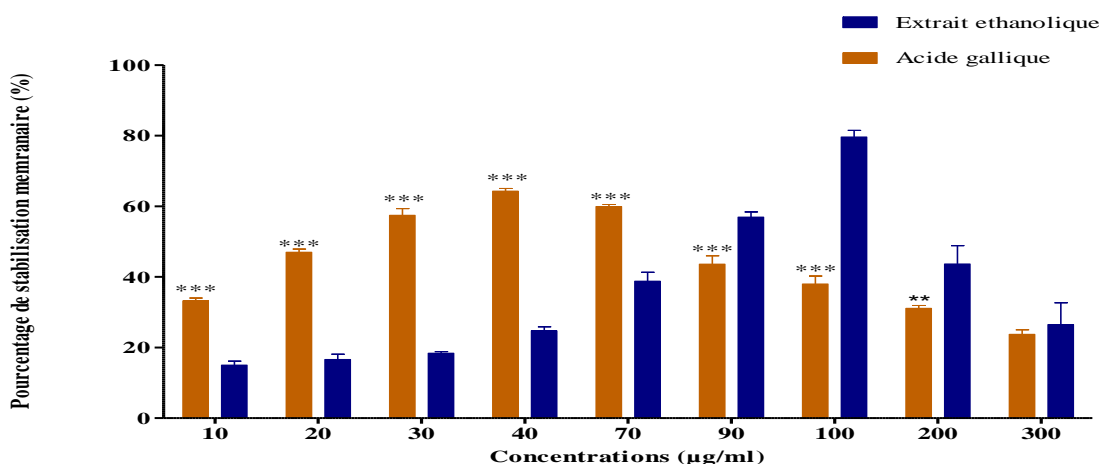
Figure 11 : Comparaison entre l'activité anti-hémolytique de l'extrait aqueux et le diclofinac (A) et l'acide gallique (B). Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4), *P<0.05. Two-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

D'après l'analyse on remarque qu'aux faibles concentrations, l'extrait aqueux présente une meilleure activité par rapport au diclofénac et un maximum de protection est de 72,39 % à 100 µg/mL, nettement supérieur à l'effet du diclofinac à la même concentration.

De même, la comparaison entre l'acide gallique et l'extrait aqueux révèle qu'à faible concentration l'acide gallique possède une meilleure activité par rapport à l'extrait aqueux, jusqu'à la concentration de 70µg/mL où ils ont montré une même activité protectrice (59%). Par contre, à forte concentration l'extrait aqueux a présenté une meilleure activité avec une différence significative par rapport à l'acide gallique.

Les mêmes comparaisons ont été faites pour l'extrait éthanolique et les résultats sont présentés dans les graphes suivants :

(A)



(B)

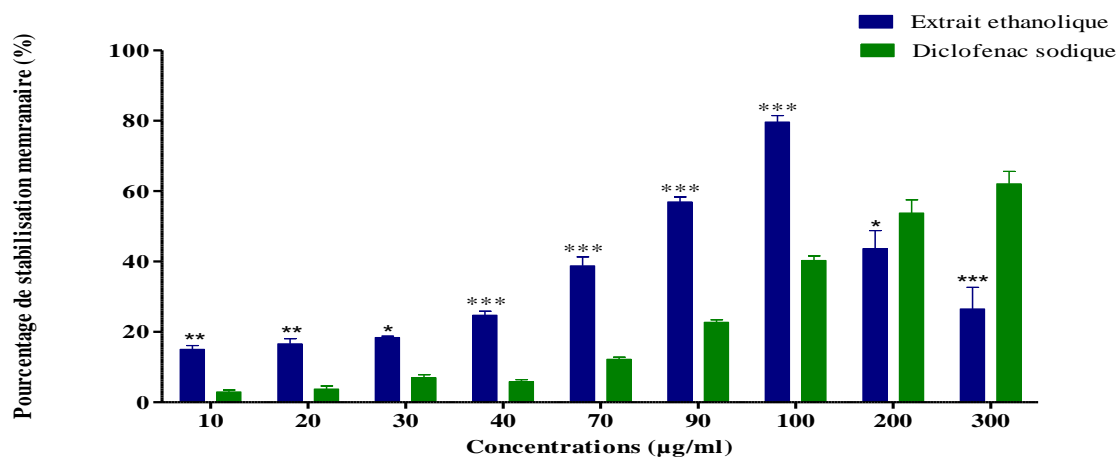


Figure 12 : Comparaison entre l'activité anti-hémolytique de l'extrait éthanolique des fruits de *P. lentiscus* et l'acide gallique (A) et le diclofinac (B). Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4), *P<0,05. Comparaison par rapport à la même concentration. Two-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

A de faibles concentrations, l'acide gallique a procuré aux globules rouges une forte protection par rapport à l'extrait éthanolique, qui n'a pas démontré d'activité à ces concentrations et un maximum d'activité a été révélé à 40 $\mu\text{g/mL}$. A partir de 90 $\mu\text{g/mL}$ l'activité anti-hémolytique de l'acide gallique commence à diminuer et celle de l'extrait éthanolique augmente (avec un maximum de 79,65% à 100 $\mu\text{g/mL}$).

Une autre comparaison a été effectuée entre l'extrait éthanolique et le diclofinac, d'après les résultats obtenus l'extrait éthanolique a montré une activité de stabilisation de la membrane efficace par rapport au diclofinac à faible concentration et un maximum a été

obtenue 100 $\mu\text{g/mL}$ avec 79,65% de protection pour l'extrait éthanolique. Le maximum obtenue pour le diclofinac est de 62,10% de protection à 300 $\mu\text{g/mL}$ ce qui suggèrent que l'extrait éthanolique est plus efficace que le diclofinac.

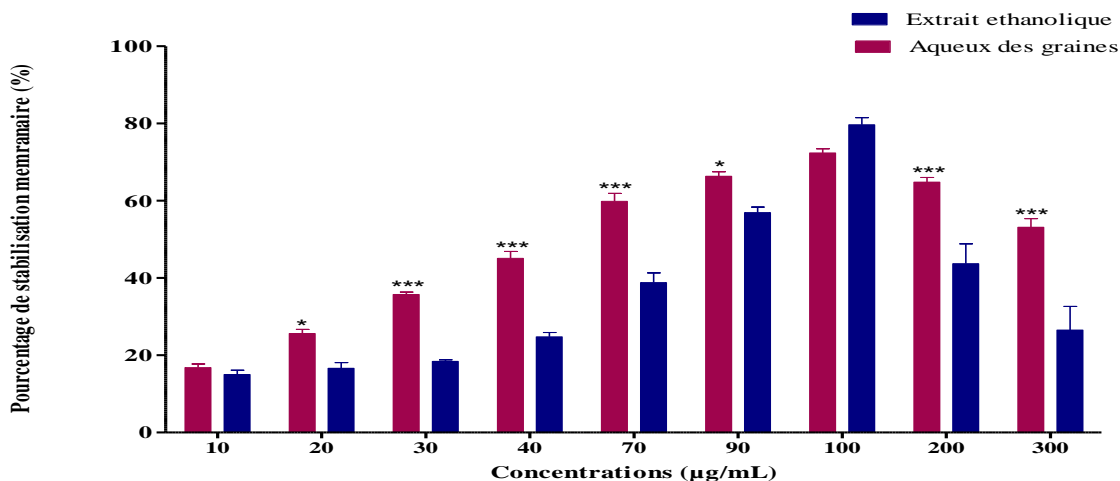


Figure 13 : Comparaison entre l'activité anti-hémolytique de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des fruits de *P. lentiscus*. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM (n=4). *P<0.05 : comparaison par rapport à la même concentration. Two-way ANOVA suivie par le test de comparaison multiple Tuckey a été utilisé pour l'analyse statistique.

Selon ce résultat, il s'est avéré que l'extrait aqueux est significativement le plus actif que l'extrait éthanolique. On remarque que pour chaque concentration le pourcentage de protection est significativement supérieur pour l'extrait aqueux que pour l'extrait éthanolique.

III. 1. 3. Evaluation de l'activité antioxydant

III. 1. 3. 1. Evaluation du pouvoir anti-radicalaire par DPPH

L'activité anti-radicalaire réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH $^\circ$) est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH $^\circ$, en présence d'un antioxydant, qui donne un hydrogène ou un électron, ainsi la forme non radicalaire DPPH-H est formée (Bortolomeazzi *et al.*, 2007). Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux et éthanolique des graines de *Pistacia lentiscus* et les molécules de référence sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH $^\circ$, par rapport aux différentes concentrations testées.

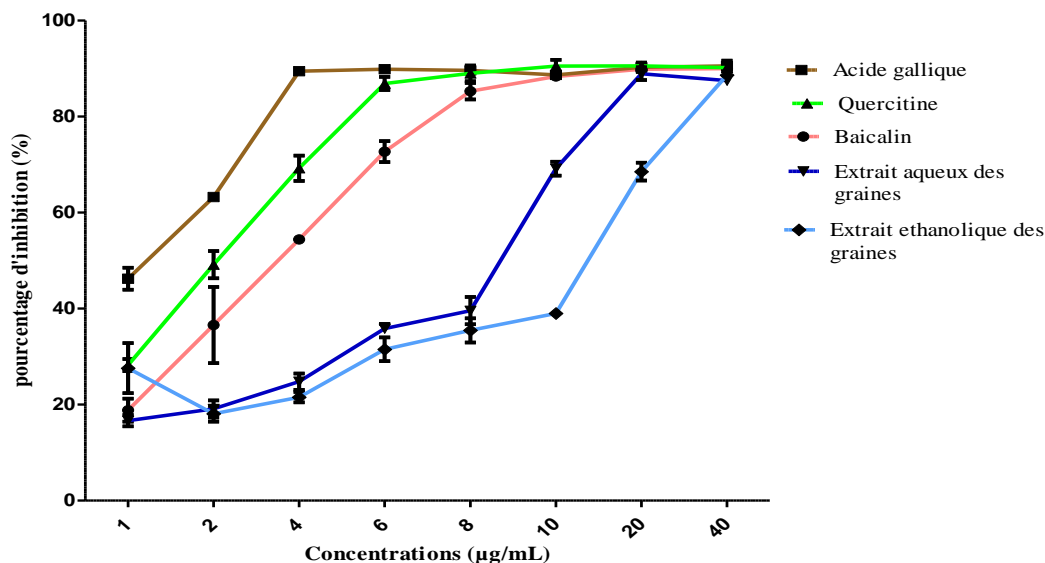


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition (%) de DPPH° par l'acide gallique, la quercitine, le baicalin et l'extrait éthanolique et aqueux des fruits de *Pistacia lentiscus*.

Les profils d'activité anti-radicalaire obtenus pour l'extrait éthanolique et aqueux du fruit de *Pistacia lentiscus* révèlent une activité scavenger, de 90 % à 20 et à 40 µg/mL, respectivement. Les molécules de référence, de leur part, ont exhibé le même pourcentage à des concentrations de 4, 8 et 20 µg/mL, pour l'acide gallique, la quercitine et le baicalin, respectivement.

I. 3. 2. Evaluation du pouvoir anti-radicalaire par ABTS^{o+}

Lorsqu'une solution du cation ABTS^o est mélangée avec une substance douée d'activité antioxydante, donne lieu à la forme réduite avec une perte de la couleur verte. La décoloration sera directement proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel. Elle permet d'évaluer le taux de neutralisation du radical ABTS^{o+} et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits étudiés.

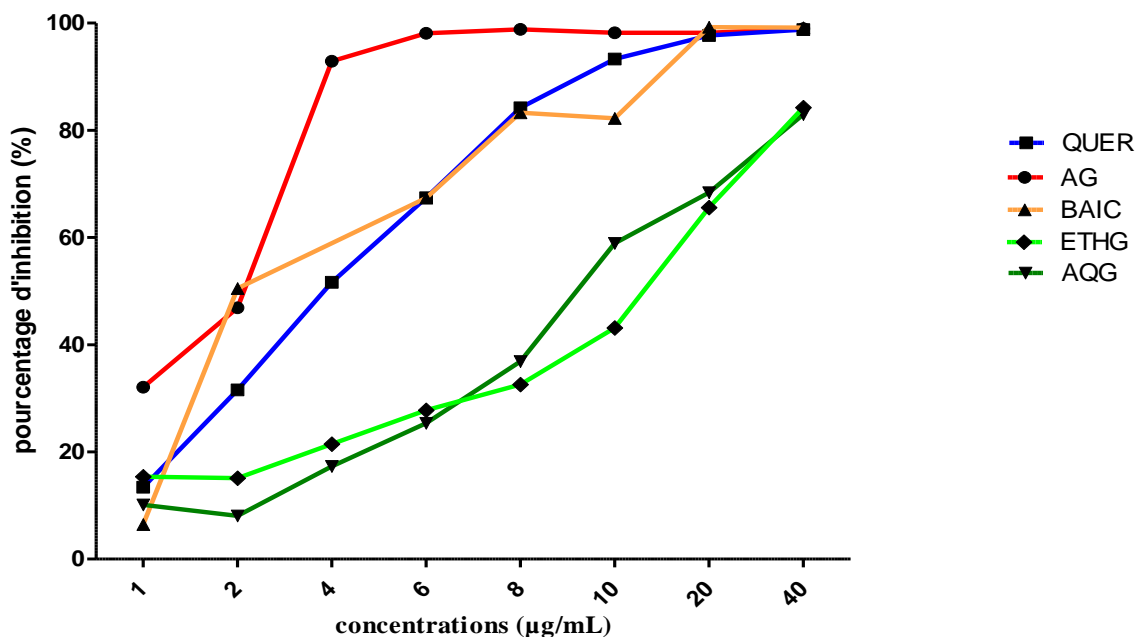


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition (%) de l'ABTS⁺ par l'acide gallique, la quercétine, le baicalin et l'extrait éthanolique et aqueux des fruits de *Pistacia lentiscus*.

Les résultats démontrés dans la figure révèlent que l'acide gallique atteint un pourcentage d'inhibition maximal de 92.90 % à la concentration 4µg/ml, quant au Baicalin et Quercétine, l'activité maximale de 97 % est révélée à la concentration de 20 µg/mL. Par ailleurs, les extraits aqueux et éthanolique des fruits de *Pistacia lentiscus* présentent un pourcentage d'inhibition de 84 % à la concentration 40 µg/mL.

Les résultats des deux tests (ABTS⁺ et DPPH^o) sont exprimés en IC₅₀ (concentration inhibitrice 50) ; c'est la concentration d'extrait qui neutralise 50 % de radical libre, plus l'IC₅₀ est faible plus l'extrait a un potentiel antioxydant puissant (Brand-Williams et al., 1995 ; Atoui et al., 2005). L'ensemble des valeurs IC₅₀ sont représenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau III : Valeurs IC₅₀ obtenus par le test de DPPH° et de l'ABTS°+ des extraits aqueux et ethanolique des graines de *Pistacia lentiscus* ainsi que les molécules de référence testées.

	IC ₅₀ (µg/mL) DPPH°	IC ₅₀ (µg/mL) ABTS°+
Baicalin	3,651±0,402	4,685±1,2435
Acide gallique	2,164±0,1055	2,369±0,084
Quercetine	2,245±0,267	3,348±0,594
Extrait aqueux des graines	8,5±0,5185	8,511±0,668
Extrait ethanolique des graines	13,19±1,485	12,13±0,585

Les IC₅₀ obtenus par les deux tests sont approximativement identiques, les résultats obtenus démontrent que l'Acide gallique, la Quercetine et le Baicalin ont une activité anti-oxydante la plus efficace, par rapport aux extraits. Par ailleurs, l'extrait aqueux de fruit de *Pistacia lentiscus* se révèle plus efficace par rapport à l'extrait ethanolique.

III. 2. Discussion

Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables, qui peuvent gêner leur utilisation à long terme. Dans ce contexte, le recours aux principes bioactifs extraits de plantes médicinales, telles que *Pistacia lentiscus*, devient une voie alternative importante à explorer, afin de concevoir de nouvelles molécules efficaces et à moindres effets secondaires.

Avant d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits ethanolique et aqueux des fruits de *Pistacia lentiscus*, un test de cytotoxicité est nécessaire pour vérifier le pouvoir cytotoxique de ces extraits et déterminer les concentrations à utiliser pour le test anti-inflammatoire. L'extrait ethanolique et aqueux des fruits de *P. lentiscus* ont révélé une cytotoxicité à la concentration de 640 µg/mL, avec un pourcentage d'hémolyse de 68,58% et 22,08% respectivement, par contre l'acide gallique a donné un pourcentage de 19,89% à 80µg/mL. Cet effet cytotoxique est concentration dépendant.

L'étude de la cytotoxicité des extraits de plantes, *in vitro*, en utilisant le globule rouge comme model a été largement utilisée (Novaes *et al.*, 2007), car sont faciles à isoler du sang et leurs membranes ont des similitudes avec d'autres membranes cellulaires (Robertis *et*

Robertis 1995). L'hémolyse des globules rouges provoque la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant, ce qui peut être détecté visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans le sérum ou le plasma (**Lemery, 1998**). Aussi, les érythrocytes sont considérés comme une cible majeure pour les radicaux libres en raison de la présence à la fois d'une forte concentration membranaire d'acides gras polyinsaturés et du transport d'oxygène associé aux molécules d'hémoglobines actives, qui sont des promoteurs puissants d'espèces réactives de l'oxygène (**Ebrahinzadeh et al., 2009**).

L'activité hémolytique de chaque extrait est liée à leur composition chimique (**Costa-Lotufu et al., 2005**). Parmi les constituants de plantes, les flavonoïdes, qui sont impliqués dans l'oxydation de l'hémoglobine, la perturbation de la structure membranaire et l'augmentation de la conductimétrie et donc l'hémolyse des érythrocytes, en raison d'effets pro-oxydants, qui peuvent l'exercer à forte concentration (**Galati et al., 2002**). Par exemple, l'acide gallique est capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} , ou Cu^{2+} en Cu^{+} , et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle (**Kessler et al., 2002**).

La méthode de GRh est la meilleure méthode pour la détermination, *in vitro*, du pourcentage de stabilisation membranaire (**Oyedapo et al., 2010**). La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale (**Chou 1997**), dont la stabilisation est importante pour limiter la réponse inflammatoire, en empêchant la libération de constituants lysosomaux de neutrophiles activés, tels que les enzymes bactéricides et les protéases, ce qui entraîne une inflammation tissulaire et des dégâts, suite à une libération cellulaire supplémentaire (**Murugasan et al., 1981**).

La stabilisation de la membrane des globules rouges a été étudiée pour établir le mécanisme d'action anti-inflammatoire des extraits ethanologique et aqueux des fruits de *Pistacia lentiscus*. Les deux extraits ont été efficaces pour inhiber l'hémolyse provoquée par la chaleur et l'hypotonie et un pourcentage de 79,65% à 100 µg/mL et 59,84% à 70 µg/mL ont été obtenus respectivement, or que l'acide gallique et le diclofinac sodique présentent un pourcentage de stabilisation de 58,65% à 30 µg/mL et 53,81% à 200 µg/mL respectivement.

L'efficacité du Diclofenac a été prouvée par plusieurs auteurs ou l'activité antihémolytique est de l'ordre de 70 % à 200 µg/mL (**Chippada, 2011 ; Rani et al., 2014 ; Garbi et al., 2017**) et plusieurs études ont rapporté l'efficacité des extraits de plantes

médicinales sur la stabilisation de la membrane du globule rouge (**Sadique et al., 1989 ; Oyedapo et al., 2004 ; Gadamsetty et al., 2013**).

Le diclofénac sodique (acide phénylacétique), est l'un des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens les plus utilisés (AINS), en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques puissantes. C'est un inhibiteur de la COX-2 et agit en diminuant le niveau d'arachidonate libre (**Goodman et Gilman, 2001**). Des études sur l'interaction du diclofenac avec les bicouches phospholipides ont montré que le diclofenac se localise préférentiellement dans les groupes de tête polaire des phospholipides et se situe à proximité de la région phosphate (**Moreno et al., 2009**). Il a la capacité de former une liaison hydrogène avec les molécules d'eau ou le groupe de tête lui-même (**Kyrikou et al., 2004**). Ce qui modifie l'affinité de la membrane pour l'eau et l'empaquetage des bicouches lipidiques. De plus, le diclofénac est chargé négativement et sa présence dans la région polaire modifie les propriétés électrostatiques des phospholipides qui influencent la structure de la bicouche lipidique (**Moreno et al., 2009**).

Les résultats obtenus dans ce présent travail fournissent des preuves pour la stabilisation de la membrane comme un mécanisme anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique des fruits de *Pistacia lentiscus*, qui peuvent éventuellement inhiber la libération du contenu lysosomique des neutrophiles au site de l'inflammation. D'une autre part, les extraits éthanolique et aqueux des fruits de *Pistacia lentiscus* ont prouvé leur efficacité anti-radicalaire, vis-à-vis, de deux radicaux synthétiques, à savoir le DPPH° et l'ABTS^{o+}, ou les valeurs IC₅₀ est de l'ordre de quelques microgrammes (8-13 ug/mL), indiquant leur potentiel antioxydant.

Des études ont démontré que de nombreux flavonoïdes et polyphénols contribuent de manière significative à l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire de nombreuses plantes (**Luo et al., 2002 ; Okoli et Akah, 2004**). Le mode d'action des extraits éthanolique et aqueux des fruits de *P. lentiscus* sur la stabilisation de la membrane des globules rouges, peut s'expliquer par le pouvoir antioxydant des polyphénols, qui neutralisent les radicaux libres générés par le milieu hypotonique. Les propriétés anti-oxydante des flavonoïdes sont liées à la présence de groupe catécho (o-dihydroxy) dans le cycle B et la double liaison 2-3 conjointement avec le groupe 4-carbonyle ainsi qu'avec les groupes 3 et 5-hydroxyle qui facilite la délocalisation d'électrons à travers la molécule de flavonoïde. La neutralisation de

ces radicaux libres protège la membrane des globules rouges de la peroxydation lipidique, qui modifie l'organisation des domaines membranaire (**Madsen et al., 2000**).

De plus, les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont basées non seulement sur leur capacité de neutraliser des radicaux libres, mais aussi sur leur chélation transitoire des métaux (**Mira et al., 2002 ; Moridani et al., 2003**). Les capacités de chélation de fer de différents flavonoïdes sont efficaces pour la protection contre le stress oxydatif (**Cesquini et al., 2003 ; Henneberg et al., 2013**).

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté les effets des interactions des flavonoïdes avec le globule rouge, où il a été démontré que les flavonoïdes pourraient atteindre toutes les régions de la bicouche lipidique et l'empêcher de l'oxydation (**Scheidt et al, 2004**). Cette interaction et tendance des polyphénols à interagir avec la bicouche lipidique dépend de leur polarité, taille et géométrie moléculaire, aussi le nombre et l'agencement des groupements hydroxyles (**Yu et al., 2011**). En effet, **Sirk et ses collègues (2008)** ont proposé que les polyphénols forment des liaisons hydrogène avec des membranes, et ce entre des groupes hydroxyles phénoliques servant de donneurs de liaisons hydrogène et d'atomes d'oxygène sur le phospholipide, comme accepteurs de liaisons de l'hydrogène. Ils ont conclu que la force de l'interaction dépend du nombre de liaisons hydrogène formées et donc du degré d'hydroxylation et des caractéristiques stéréochimiques des polyphénols.

D'une autre part, la plupart des flavonoïdes sont peu solubles dans l'eau et similaires aux composés lipophiles et ont tendance à s'accumuler dans les membranes biologiques, en particulier dans les radeaux lipidiques, où elles peuvent interagir avec différents récepteurs et transducteurs de signaux et influencer leur fonctionnement par la modulation du comportement en phase lipidique ou interagir avec les lipoprotéines livrées à des radeaux et pénètrent dans le cytoplasme par une endocytose dépendante de caveoline (**Yu et al., 2011**).

A cela s'ajoute l'interaction avec les cations métalliques où, lorsque deux ou trois molécules de flavonoïdes interagissent avec un cation métallique, la lipophilie du complexe augmente, car les sites les plus polaires des flavonoïdes sont enterrés à l'intérieur de l'agrégat moléculaire, ce qui facilite la protection des lipides membranaires contre l'oxydation. En outre, les complexes flavonoïdes-métal peuvent fonctionner comme des « attaches » moléculaires qui pénètrent dans les sites hydrophobes des membranes ou des protéines et initient leur adhérence et leur agrégation (**Tarahovsky et al., 2014**).

Les flavonoïdes à faible concentration diminuent la fluidité membranaire, cette dernière a une influence sur les enzymes membranaires, les récepteurs ainsi que l'efficacité de la réaction des composants membranaires, qui pourraient être modulées par des changements de la fluidité. Les effets exercés par les flavonoïdes sur la fluidité de la membrane ressemblent à ceux des cholestérols, la présence de cholestérol diminue les effets d'agrégation membranaire causés par la diminution de l'hydratation de la surface membranaire (**Arora et al, 2000**). Par contre, à forte concentration les flavonoïdes provoquent la transformation de la forme érythrocytaire en forme d'échinocytes et cause des altérations de la perméabilité (**Pawlikowska et al, 2003**).

Conclusion
&
Perspectives

Les anti-inflammatoires sont efficaces pour le traitement des symptômes de nombreuses maladies inflammatoires, mais leurs utilisations sont limitées en raison de leurs effets indésirables, qui peuvent gêner leur utilisation à long terme. Dans ce contexte Le recours à l'utilisation des plantes médicinales riches en molécules bioactives en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Parmi ces plantes, *Pistacia lentiscus*, qui possède un pouvoir pharmacologique, dont les indications thérapeutiques sont nombreuses, notamment les activités : antibactérienne, analgésique, antioxydante, grâce à sa richesse en composés actifs.

C'est dans ce but que s'inscrit notre travail qui consiste à évaluer l'activité antiinflammatoire, *in vitro*, des extraits ethanologique et aqueux des graines de *Pistacia lentiscus* sur la stabilité de la membrane du globule rouge, qui a des similitudes avec d'autres membranes cellulaires, notamment la membrane du lysosome.

L'exposition des érythrocytes à des conditions nuisibles telles que, le milieu hypotonique et la chaleur, entraîne la lyse de leurs membranes accompagnée par l'hémolyse. Les résultats de ce présent travail démontrent que les extraits ethanologique et aqueux des graines de *Pistacia lentiscus* ont des effets anti-hémolytique et antioxydant considérables, comparativement à la molécule de composés phénoliques testée, à savoir l'acide gallique, ce qui indique l'efficacité de ces deux extraits à stabiliser la membrane du globule rouge et donc la membrane du lysosome impliqué dans l'inflammation, en empêchant ainsi, la libération et l'action des intercesseurs, tels que la sérotonine, l'histamine, les leucotriènes et les prostaglandines.

Ces résultats montrent une efficacité comparable à celle du traitement par un AINS qui est le diclofinac sodique, ce qui confirme la validité de l'indication de ces deux extraits de fruit de *P.lentiscus* en médecine traditionnelle, pour prévenir les processus inflammatoires.

La richesse de l'extraits ethanologique et aqueux de cette plante en composés phénolique dont l'activité anti-inflammatoire a été prouvée par plusieurs études peut justifier cette activité.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, mais des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination des

composés actifs dans les extraits de *Pistacia lentiscus* et l'évaluation de leurs effets sur les signalisations impliquées dans le processus inflammatoire, ainsi que le mécanisme de la cytotoxicité et de stabilisation sur d'autres membranes biologiques à savoir, le lysosome.

Références bibliographiques

- **Abdelwahed, A., Bouhleb, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., ... et Dijoux-Franca, M. G. (2007).** Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-biological interactions*, 165(1), 1-13.
- **Aguilar, J. L., Rojas, P., Marcelo, A., Plaza, A., Bauer, R., Reininger, E., ... et Merfort, I. (2002).** Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 81(2), 271-276.
- **Ali-Shtayeh, M. S., Yaghmour, R. M. R., Faidi, Y. R., Salem, K., et Al-Nuri, M. A. (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(3), 265-271.
- **Ali-Shtayeh, M. S., Yaniv, Z., & Mahajna, J. (2000).** Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1), 221-232.
- **Al-Said, M. S., Ageel, A. M., Parmar, N. S., et Tariq, M. (1986).** Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal antiulcer activity. *Journal of ethnopharmacology*, 15(3), 271-278.
- **Ansari, S.H., Nahida, A., et Siddiqui, A. N. (2012).** *Pistacia lentiscus*: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(4), 1620.
- **Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., et Strasburg, G. M. (2000).** Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch Biochem Biophys*, 373: 102–9.
- **Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., et Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*, 89(1), 2736.
- **Babior, B. M. (1984).** The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest*, 73: 599601.
- **Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R., ... et Delporte, C. (2008).** Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 116(2), 263-269.
- **Balan, K. V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, J. H., ... et 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.
- **Barton, G. M. (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 118: 413-420.
- **Bellakhdar, J. (2003).** *Le Maghreb à travers ses plantes: Plantes, productions végétales et traditions au Maghreb.* Editions Le Fennec.
- **Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

- **Borregaard, N., Lollike, K. L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielson, M. H., et Bainton, D. F. (1993).** Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol*, 51:187-198.
- **Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., et Pizzariello, A. (2007).** Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*, 100(4), 1481-1489.
- **Boukeloua, A., Belkhiri, A., Hamdi Pacha, Y., Djerrou, Z., Maamri Z. (2011).** Caractérisation physico-chimique et étude toxicologique *Pistacia lentiscus L. Depot institutionnel de l'Université Kasdi Merbah Ouargla UKMO.*
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., et Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- **Bulmus, V., Woodward, M., Lin, L., Murthy, N., Stayton, P., et Hoffman, A. (2003).** A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membranedisruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of Controlled Release*, 93(2), 105-120.
- **Burmester, G. R. et pezutto A (2000).** Atlas de poche d'immunologie. Paris :flammarion .293p.
- **Camu, F., Lauwers, M. H., et Vanlersberghe, C. (1995).** Side effects of NSAIDs and dosing recommendations for ketorolac. *Acta anaesthesiologica Belgica*, 47(3), 143-149.
- **Capet, C., Druesne, L., Chassagne, P. H., et Doucet, J. (2001).** Les effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez le sujet âgé. *Revue Gériatr*, 26, 379-84.
- **Castola, V., Bighelli, A., et Casanova, J. (2000).** Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus L.* from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(1), 79-88.
- **Cesquini, M., Torsoni, M.A., Stoppa, G.R., et Ogo, S.H. (2003).** t-BOOHinduced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed. Pharmacothe*, 57: 124–129.
- **Cesquini, M., Torsoni, M.A., Stoppa, G.R., et Ogo, S.H. (2003).** t-BOOHinduced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed. Pharmacothe*, 57: 124–129.
- **Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M., et Stocker, P. (2008).** Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(10), 921-924.
- **Charles N Serhan, Peter A Ward and Derek W Gilroy (2010).** Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press, 2-3.
- **Charpentier B.- Hamon F.- Lorleac H. – Harlay A. – Huard A. – Ridoux L. et Chansallé S. (2004).** Guide du préparateur en pharmacie, 2èmeEdition, Paris, Malione, pp : 40.

- **Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, A. B., Sur, T. K., Mandal, S. C., & Bhattacharya, S. K. (2002).** Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2), 229-237.
- **Chippada, S. C., Volluri, S. S., Bammidi, S. R., et 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.
- **Congo M., (2012).** Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 42p.
- **Costa-Lotufo, L. V., Khan, M. T. H., Ather, A., Wilke, D. V., Jimenez, P. C., Pessoa, C., ... et de Moraes, M. O. (2005).** Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 21-30.
- **Coste H (1937).** Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Second Tirage, Paris - Librairie des Sciences et des Arts.
- **Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman Al and Szabo C (1998).** Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med*, 24(3), 450-459.
- **Dangoumau, J., Moore, n., Molimard, m., Fourrier-r a, l. K., Haramburu, f., Miremont-salame, g., et Titier, k. (2006).** Pharmacologie générale. Copyright ISBN.574p.
- **Dedoussis, G. V., Kaliora, A. C., Psarras, S., Chiou, A., Mylona, A., Papadopoulos, N. G., & Andrikopoulos, N. K. (2004).** Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174(2), 293-303.
- **Delaunay, J. (2007).** The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood reviews*, 21(1), 1-20.
- **Delille,L, (2007).** les plantes médicinales d'Algerie .ALGER BERTI editions, 240p
- **Descamps-Latscha, B., et Witko-Sarsat, V. (1996).** Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 36(3), 310-314.
- **Douce t J.(1998).** Thérapeutique de la personne âgée. l'Ed. Paris: Maloine ,
- **Ebrahimzadeh, M. A., Ehsanifar, S., et Eslami, B. (2009).** *Sambucus ebulus* elburensis fruits: A good source for antioxidants. *Pharmacognosy magazine*, 5(19), 213.
- **Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., et Henson, P. M. (1998).** Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101:890-898.

- Franzini, E., Sellak, H., Hakim, J., et Pasquier, C. (1993).** Oxidative damage to lysozyme by the hydroxyl radical; comparative effects of scavengers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1203: 11-17.
- **Gadamsetty, G., Maru, S., Tyagi, A., et Chakravarthula, S. N. (2013).** Antiinflammatory, cytotoxic and antioxidant effects of methanolic extracts of *Drypetes sepiaria* (Euphorbiaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(5), 274-282.
 - **Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J. X., et O'Brien, P. J. (2002).** Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 177(1), 91-104.
 - **Garbi, M. I., Mohammed, S. F., Magzoub, A. A., Hassabelrasoul, R. M., Saleh, M. S., Badri, A. M., Ibrahim, I. T., Elshikh, A.A., et Kabbashi, A. S. (2017).** In vitro anti-inflammatory properties of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* flowers.
 - **Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., et Komaitis, M. (2008).** Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*, 107(3), 1120-1130.
 - **Gaudin, P., Troame, C., Monier, F., Zaoui, P., Barro, C., Polak, B., ... et Morel, F. (1998).** Protéolyse matricielle, protéolyse focalisée et inflammation. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 56, No. 6, pp. 661-9).
 - **Giner-Larza, E. M., Máñez, S., Recio, M. C., Giner, R. M., Prieto, J. M., Cerdá-Nicolás, M., et Ríos, J. L. (2001).** Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *European journal of pharmacology*, 428(1), 137-143.
 - **Gokhale, A. B., Damre, A. S., Kulkarni, K. R., et Saraf, M. N. (2002).** Preliminary evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *S. lappa*, *A. speciosa* and *A. aspera*. *Phytomedicine*, 9(5), 433-437.
 - **Goodman and Gilman (2001).** The pharmacological basis of therapeutics. 10th edition. Pp. 690, 694-695. McGraw.Hill.Company, Newyork.
 - **Govindappa, M., et poojashri, M. N. (2011).** Antimicrobial, antioxydant 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.
 - **Griffin, M. R., et Scheiman, J. M. (2001).** Prospects for changing the burden of nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicity. *The American journal of medicine*, 110(1), S33-S37.
 - **Gros, M., Vrhovec, S., Brumen, M., Svetina, S., et Zeks, B. (1996).** Low pH induced shape changes and vesiculation of human erythrocytes. *General physiology and biophysics*, 15(2), 145-163.
- Haeffner-Cavaillon, N. (1998).** La réponse inflammatoire. Seconde partie. *La Revue de médecine interne*, 19(10), 748-750.

- **Haest, C. W. M. (1982).** Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 694(4), 331-352.
- **Hamad H Hasan, Ibrahim H Habib, Mariam H Gonaïd and Mojahidul (2011).** Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in al jabal al-akhdar. *J Nat Prod Plant Resour*, 1 (1), 15-23.
- **Hameed, B. H., et El-Khaiary, M. I. (2008).** Equilibrium, kinetics and mechanism of malachite green adsorption on activated carbon prepared from bamboo by K₂CO₃ activation and subsequent gasification with CO₂. *Journal of Hazardous Materials*, 157(2), 344-351.
- **Henneberg, R., Otuki, M.F., Furman, A.E., Hermann, P. Nascimento, A.J. do, et Leonart, M.S. (2013).** Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 35: 52–55.
- **Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., et Reginster, J. Y. (2001).** Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Rev Med Lieg*, 56: 6: 433-442.
- **Hess, J. R. (2006).** An update on solutions for red cell storage. *Vox sanguinis*, 91(1): 13-19.
- **Holbrook, N.J., Ikeyama, S. (2002).** Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects. *Biochem Pharmacol*, 64:999– 1005.
- **Holbrook, N.J., Ikeyama, S. (2002).** Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects. *Biochem Pharmacol*, 64:999– 1005.
- **Hou C., Kirchner, T., et Singer, M. (2004).** In vivo activity of phospholipase C inhibitor in chronic and acute inflammatory reactions. *J. Pharmacology Exp. Therapeutics*, 309: 609-704.
- **Huwez, F. U., et Al-Habbal, M. J. (1986).** Mastic in treatment of benign gastric ulcers. *Journal of Gastroenterology*, 21(3), 273-274.
- **Iauk, L., Ragusa, S., Rapisarda, A., Franco, S., et Nicolosi, V. M. (1996).** In vitro antimicrobial activity of Pistacia lentiscus L. extracts: preliminary report. *Journal of chemotherapy*, 8(3), 207-209.
- **Ilani, A., et Granoth, R. (1990).** The pH dependence of the hemolytic potency of bile salts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1027(2) :199-204.
- **Jagels, M. A., Daffern, P. J., et Hugli, T. E. (2000).** C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. *Immunopharmacology*, 46(3), 209-222.
- **Janakat, S., et Al-Merie, H. (2002).** Evaluation of hepatoprotective effect of Pistacia lentiscus, Phillyrea latifolia and Nicotiana glauca. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1), 135-138.

- **Jilroy D, Colvillr-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ et Willoughby DA (1999).** Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*, 5(6), 698-701.
- **JIRI S., Marketa R., Olga K., Petr S., Vojtech J., Libuse T., Ladislav H., Miroslava B., Josef Z., IVO P., Rene K., (2010).** Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molécules*. (15): 8618-8640.
- **Johnson, A. G., Nguyen, T. V., et Day, R. O. (1994).** Do nonsteroidal antiinflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. *Annals of internal medicine*, 121(4), 289-300.
- **Kaji. D., et Amblard, J. (1986).** Volume-sensitive K Transport in Human Erythrocytes. *Journal of General Physiology*; 88:719-38.
- **Kessler, R. C., Andrews, G., Colpe, L. J., Hiripi, E., Mroczek, D. K., Normand, S. L., ... et Zaslavsky, A. M. (2002).** Short screening scales to monitor population prevalences and trends in non-specific psychological distress. *Psychological medicine*, 32(06), 959-976.
- **Klebanoff, S. J., Gallin, M. G., et Snyderman, R. (1992).** Oxygen metabolites from phagocytes. Inflammation: basic, principles and clinical correlates. *New York Raven Press*, 541–588.
- **Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., et Mitchell, R. (2007).** Robbins Basic Pathology. 8th Edition, 20-60.
- **Küpeli, E., Şahin, F. P., Çalış, İ., Yeşilada, E., et Ezer, N. (2007).** Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Journal of ethnopharmacology*, 112(2), 356-360.
- **Lee, M., & Feldman, M. (1997).** The aging stomach: implications for NSAID gastropathy. *Gut*, 41(4), 425-426.
- **Leonti, M., Casu, L., Sanna, F., et Bonsignore, L. (2009).** A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited?. *Journal of ethnopharmacology*, 121(2), 255-267.
- **Lev, E., & Amar, Z. (2002).** Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2), 131-145.
- **Lien, E. J., Ren, H.H., et Wang, (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxydants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3), 285-294.
- **Longo, L., Scardino, A., et Vasapollo, G. (2007).** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 360-364.
- **Luo, X. D., Basile, M. J., et Kennelly, E. J. (2002).** Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (star apple). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50:1379- 1382.

- **Maataoui, B. S., Hmyene, A., et Hilali, S. (2006).** Activites antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie [*Opuntia ficus indica*]. *Lebanese science journal*, 7(1), 3-8.
- **Madsen, H. L., Andersen, C. M., Jorgensen, L. V., et Skibsted, L. H. (2000).** Radical scavenging by dietary flavonoids. A kinetic study of antioxidant efficiencies. *Eur Food Res Technol*, 211: 240–6.
- **Mansouri, M. T., Farbood, Y., Sameri, M. J., Sarkaki, A., Naghizadeh, B., et Rafeirad, M. (2013).** Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food chemistry*, 138(2), 1028-1033.
- **Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E., et Perversi, L. (2001).** Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *Journal of Chemotherapy*, 13(6), 611-614.
- **Marsolais, D., et Frenette, J. (2005).** Inflammation et réparation tendineuse. *médecine/sciences*, 21(2): 181-186.
- **Maxia, A., Sanna, C., Frau, M. A., Piras, A., Karchuli, M. S., et Kasture, V. (2011).** Anti-inflammatory activity of *Pistacia lentiscus* essential oil: involvement of IL-6 and TNF-alpha. *Natural product communications*, 6(10), 1543-1544.
- **Mezni, F., Maaroufi, A., Msallem, M., Boussaid, M., Khouja, M. L., & Khaldi, A. (2012).** Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. fruit oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(39), 52665271.
- **Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., et Jennings, K.R. (2002).** Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res*, 36: 1199–1208.
- **Mizushima, Y. (1964):** Inhibition of protein denaturation by anti-rheumatic or antiphlogistic agents. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 149, 1-7.
- **Mizushina, Y. and Kobayashi, M. (1968):** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum especially with some biologically active proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 169-171.
- **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- **Monaco, P., Previtera, L., et Mangoni, L. (1982).** Terpenes in *Pistacia* plants: a possible defence role for monoterpenes against gall-forming aphids. *Phytochemistry*, 21(9), 2408-2410.
- **More D et White J (2005).** Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, 18-24.
- **Moreno, M. M., Garidel, P., Suwalsky, M., Howe, J., et Brandenburg, K. (2009).** The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: a physicochemical study with lecithin phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1788(6), 1296-1303.

- **Moridani, M.Y., Pourahmad, J., Bui, H., Siraki, A., et O'Brien, P.J. (2003).** Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic. Biol. Med*, 34: 243–253.
- **Murugasan, N., Vember, S., Damodharan, C. (1981).** Studies on erythrocyte membra-ne IV. *In vitro* haemolytic activity of Oleander extract. *Toxicol Lett*, 8:3338.
- **Muster, D. (2005).** Medicaments de l'inflammation. EMC-Stom,(1) :21-29.
- **Nahida, A. S., et Siddiqui, A. N. (2012).** *Pistacia lentiscus*: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(4), 1620.
- **Naik, S. R., et Sheth, U. K. (1976).** Inflammatory process and screening methods for anti-inflammatory agents-a review. *Journal of Postgraduate Medicine*, 22(1) : 5.
- **Nardi, G. M., Felippi, R., DalBó, S., Siqueira-Junior, J. M., Arruda, D. C., Delle Monache, F., ... et Ribeiro-do-Valle, R. M. (2003).** Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine*, 10(2-3), 176-184.
- **Nathan, C. (2002).** Points of control in inflammation. *Nature*, 420: 846-852.
- **Novaes, M. R. C. G., Novaes, L. C. G., Melo, A. L., & Recôva, V. L. (2007).** Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. *Comun. ciênc. saúde*, 18(3), 227-1236.
- **Okoli, C. O., et Akah, P. A. (2004).** Mechanism of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. beauv (Araceae). *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour.*, 79:473-481.
- **Orhan, D. D., Hartevioglu, A., Küpeli, E., et Yesilada, E. (2007).** In vivo antiinflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *Journal of ethnopharmacology*, 112(2), 394-400.
- **Oyedapo, O. O., Akinpelu, B. A., Akinwunmi, K. F., Adeyinka, M. O., et Sipeolu, F. O. (2010).** Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2(4), 46-51.
- **Palevitch D et Yaniv Z (2000).** Medicinal plants of the Holy Land. Modan Publishing House, 9-88.
- **Pasquier, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, N ° 276.
- **Pawlikowska-Pawlęga, B., Gruszecki, W. I., et Misiak LE Gawron, A. (2003).** The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochem Pharmacol*, 66: 605–12.
- **Prchal, J. T., et Gregg, X. T. (2005).** Red cell enzymes. ASH Education Program Book, 2005(1), 19-23.
- **Prichard, A. J. (2004).** The use of essential oils to treat snoring. *Phytotherapy Research*, 18(9), 696-699.
- **Rahmani, S., Cheriti, A., Belboukhari, N., et Sekkoum, K. (2016).** evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *limoniastrum feei* (plumbaginacea). *algerian journal of arid environment "ajae"*, 6(1), 80-86.

- **Rani, A. A., Punitha, S. M. J., et Rema, M. (2014).** Anti-inflammatory activity of flower extract of *Cassia auriculata*-an in vitro study. *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.*, 4, 57-60.
- **Rankin, J. A. (2004).** Biological mediators of acute inflammation. *AACN Advanced Critical Care*, 15(1), 3-17.
- **Ravat, F., Payre, J., Peslages, P., Fontaine, M., et Sens, N. (2011).** La brûlure : une pathologie inflammatoire Brun. *Pathologie Biologie*, 59 : 63-72.
- **Raynaud, P. (2008).** Anatomie pathologie et inflammation conception d'ensemble. *Anat. pathol.*, 1-5.
- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., et Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- **Remila, S., Atmani-Kilani, D., Delemasure, S., Connat, J. L., Azib, L., Richard, T., & Atmani, D. (2015).** Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 7(3), 274-286.
- **Robertis F A, Robertis E M H. (1995).** Cell and molecular biology, London, UK Saunders, 239-45.
- **Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., et Tattini, M. (2002).** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 7986.
- **Rousselet, M., Vignaud, J. M., Hofman, P., et Chatelet, F. P. (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire. 1-57.
- **Russo-Marie, F. (1998).** L'inflammation. *John Libbey Eurotext, Paris*.
- **Sadique, J., Al-Rqobah, W. A., Bughaith, M. F., et El-Gindy, A. R. (1989).** The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*, 60, 525-532.
- **Scheidt, H. A., Pampel, A., Nissler, L., Gebhardt, R., et Huster, D. (2004).** Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1663: 97-107.
- **Scherrer, A. M., Motti, R., et Weckerle, C. S. (2005).** Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 97(1), 129-143.
- **Sébahoun, G. (2005).** hématologie clinique et biologique. France: Arnett. 2em edition. 78
- **Signalet, j. (2004).** l'alimentation ou la troisième médecine .3-rue jean-françoisgerbillon, 75006 paris ; François-Xavier de Guibert. 658p
- **Sellak, H., Franzini, E., Hakim, J., et Pasquier, C. (1992).** Mechanism of lysozyme inactivation and degradation by iron. *Arch. Biochem. Biophys*, 299: 172178.

- **Selye, H. (1953):** Use of granuloma pouch technique in study of antiphlogistic corticoids. *Proc. Soc. Expt. Biol. med.* 82, 328-333.
 - **Sirk, T. W., Brown, E. F., Sum, A. K., Friedman, M. (2008).** Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes. *J. Agric. Food. Chem.*, 56: 7750–7758.
 - **Skidmore I. F. and Whitehouse M. W. (1965):** Effect of non-steroid antiinflammatory drugs on aldehyde binding to plasma albumin: a novel *in vitro* assay for potential antiinflammatory activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 17, 671-673.
 - **Skidmore I. F. and Whitehouse M. W. (1965):** Effect of non-steroid antiinflammatory drugs on aldehyde binding to plasma albumin: a novel *in vitro* assay for potential antiinflammatory activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 17, 671-673
 - **Skidmore I. F. and Whitehouse M. W. (1965):** Effect of non-steroid antiinflammatory drugs on aldehyde binding to plasma albumin: a novel *in vitro* assay for potential antiinflammatory activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 17, 671-673
 - **Smith, J. A. (1994).** Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.*, 65: 672-86.
 - **Stevens, A., et Lowe, J. (1997).** *Histologie humaine.* De Boeck Supérieur. 1eme edition. 100-105.
 - **Stevens, A., Lowe, J., et Young, B. (2004).** *Anatomie pathologique.* De Boeck Supérieur.
 - **Stocker, R., et Keaney, J. F. (2004).** Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*, 84(4), 1381-1478.
 - **Tanaka, I., Nakai, Y., Jingami, H., Fukata, J., Nakao, K., Oki, S., et Imura, H. (1980).** Existence of γ -melanotropin (γ -MSH)-like immunoreactivity in bovine and human pituitary glands. *Biochemical and biophysical research communications*, 94(1), 211-217.
 - **Tarahovsky, Y. S., Kim, Y. A., Yagolnik, E. A., et Muzafarov, E. N. (2014).** Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(5): 1235-1246.
- Thomson NM.(1995) .**Drugs and the kidney in the elderly. *Med J Australia*;162:5437.
- **Trabelsi, H., Cherif, O. A., Sakouhi, F., Villeneuve, P., Renaud, J., Barouh, N., ... & Mayer, P. (2012).** Total lipid content, fatty acids and 4-desmethylsterols accumulation in developing fruit of *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Tunisia. *Food chemistry*, 131(2), 434-440.
 - **Valensi, F. (2005).** Morphologie des cellules sanguines normales. *EMCHématologie*, 2(1), 1-13.
 - **Vaubourdolle, m. (2007).** *Medicaments.france* : Wolters Kluwer France.
 - **Vaya, J., et Mahmood, S. (2006).** Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors*, 28(3, 4), 169-175.

- **Vidhya, R., et Udayakumar, R. (2016).** phytochemical screening and evaluation of in vitro haemolytic, thrombolytic and antiinflammatory activities of aerva lanata (L). Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 6(7), 5965-5973.
- **Villar, A., Sanz, M. J., & Paya, M. (1987).** Hypotensive effect of Pistacia lentiscus L. International Journal of Crude Drug Research, 25(1), 1-3.
- **Wajcman, H. (2005).** Hémoglobines: structure et fonction. EMC-Hématologie, 2(3), 145-157.
- **Ward, C., Dransfield, I., Murray, J., Farrow, S. N., Haslett, C., et Rossi, A. G. (2002).** Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of IκBα degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-γ-independent mechanism. *The Journal of Immunology*, 168(12) : 6232-6243.
- **Weill, B., Batteux, F., et Dhainaut, J. (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
- **Wibowo, N., Setyadhi, L., Wibowo, D., Setiawan, J., et Ismadji, S. (2007).** Adsorption of benzene and toluene from aqueous solutions onto activated carbon and its acid and heat treated forms: influence of surface chemistry on adsorption. Journal of Hazardous Materials, 146(1), 237-242.
- **Wilhelm, G. (1966)** In: "Die Entzündung Grundlagen and Pharmakologische Beeinflussung! ! (Heilmeyer, L. and Heimeyer, V., Eds.) pp. 266-277. Urban and Schwarzenberg, Munich, Berlin, Veina.
- **williams IW, Burke W, steel RW (1988).** complement : function and clinical relevance .Ann Allergy, 60, 293-301.
- **Winter, C. A. and Portar, C. C. (1957):** Effect of alterations in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydro-cortisone esters. J. Amer. Pharm. Sci. Ed. 46,515-519.
- **Wood, S. C., et Lenfant, C. (1987).** Phylogeny of the gas-exchange system: Red cell function. *Comprehensive Physiology*.
Wu,JH.,Tung,Yt., Wang, S .Y., Shyur, L. F., Kuo, Y. H.,et Chang,S.T.(2005).phnolic antioxydants from the heartwood of acacia confuse. Journal of agricultural and food chemistry, 53(15),5917-5921.
- **Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., ... et Takaishi, Y. (1995).** Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. Journal of ethnopharmacology, 46(3), 133-152.
- **Yu, X., Chu, S., Hagerman, A. E., et Lorigan, G. A. (2011).** Probing the interaction of polyphenols with lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(12) : 6783-6789.
- **Ziche, M., Morbidelli, L., Pacini, M., Geppetti, P., Alessandri, G., et Maggi, C. A. (1990).** Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvascular research*, 40(2), 264-278.

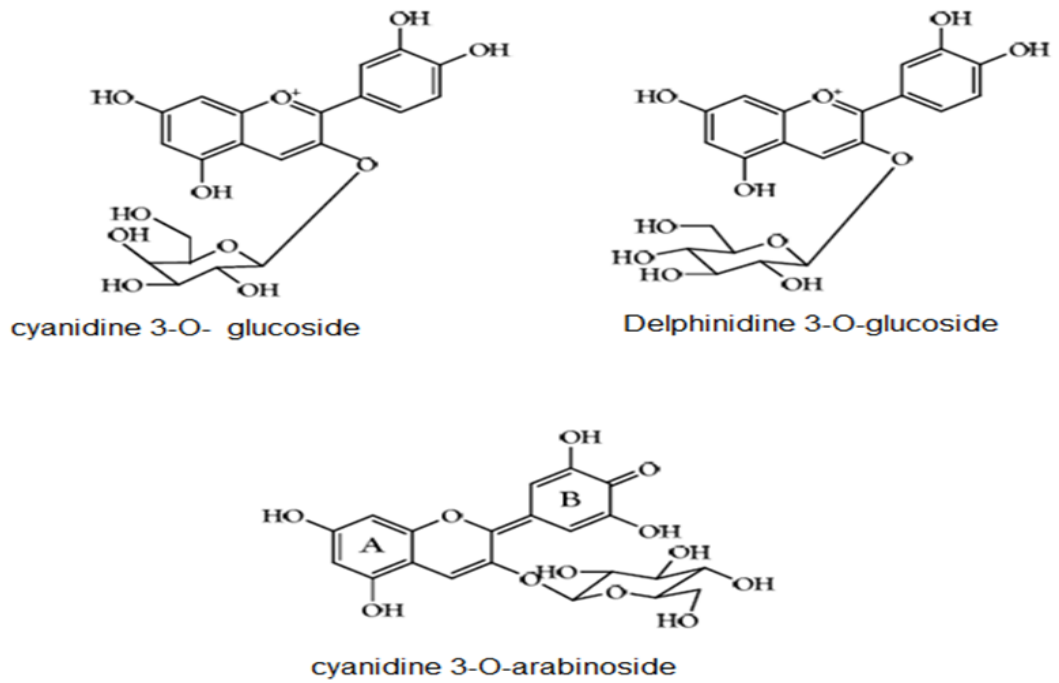
Annexes

ANNEXE

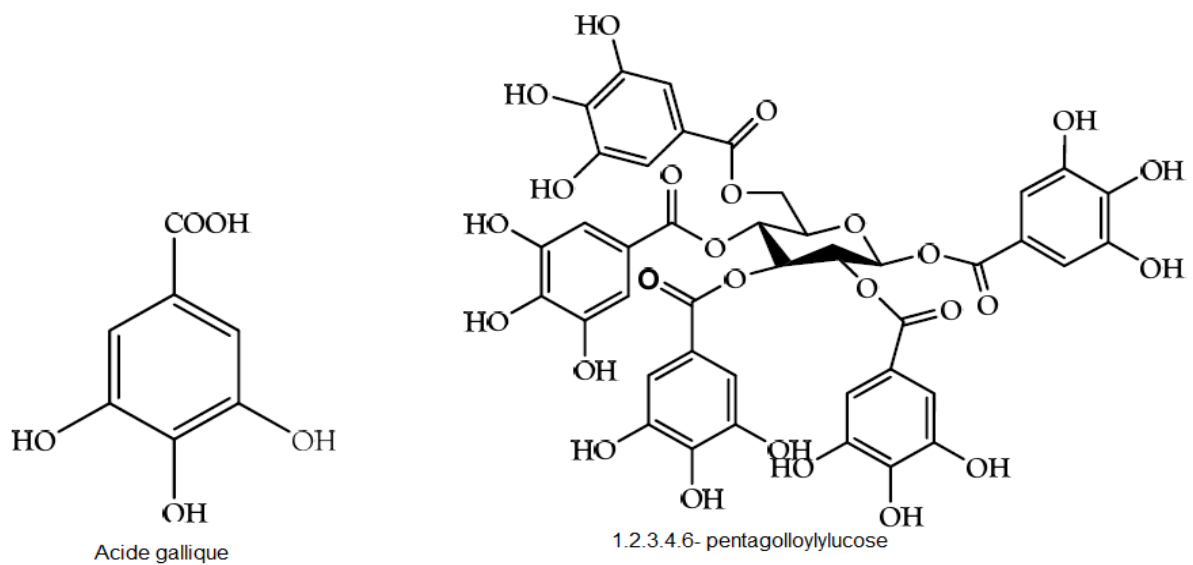
Annexe I : Rôle des médiateurs de l'inflammatoire.

Médiateur	Rôle dans l'inflammation	Références
Amines vasoactives (Histamine et Sérotonine)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Premières médiateurs libérés lors du déclenchement de l'inflammation. ➤ Assurent la vasodilatation. ➤ Induisent l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rankin, 2004. • Stevens et Low, 1997.
Kinines (bradykinine et kallidine)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Accroît la vasodilatation et la perméabilité vasculaire. ➤ Stimule la contraction des muscles lisses. ➤ Responsable de la douleur. ➤ Participent à l'apparition de l'œdème et à l'augmentation de la chaleur locale. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cavaillon, 1998. • Rankin, 2004.
Cytokines	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Assurent la communication entre les cellules immunitaires et la régulation des réponses inflammatoires. ➤ Contrôle la prolifération, la maturation et la différenciation des cellules hématopoïétiques. ➤ Activité pro-coagulante et stimulent la sécrétion de leucotriènes et du PAF. ➤ Action sur le système nerveux centrale, les hépatocytes, les ostéoclastes et les cellules musculaires lisses. ➤ Rôle dans les mécanismes de destruction tissulaire (induit la sécrétion de prostaglandines et de collagénase). 	<ul style="list-style-type: none"> • Descamps-Latscha et Wltsko-Sarsat, 1996. • Henrotin <i>et al.</i>, 2001.
Chimokines	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rôle essentiel dans les mécanismes de recrutement cellulaire et d'entretien de la réaction inflammatoire. ➤ Effet de priming sur la plupart des fonctions des neutrophiles, basophiles et les lymphocytes T. 	<ul style="list-style-type: none"> • Descamps-Latscha et Wltsko-Sarsat, 1996.
Neuropeptides (La substance P)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Augmentent la perméabilité vasculaire. ➤ Stimulent la production de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales. ➤ Stimulent la production de prostaglandines et FAO par les macrophages. ➤ Induisent l'expression d'ICAM-1 par les lymphocytes T. 	<ul style="list-style-type: none"> • Henrotin <i>et al.</i>, 2001. • Tanaka <i>et al.</i>, 1980. • Ziche <i>et al.</i>, 1990.

	➤ Impliquées dans le remodelage de tissus enflammés.	
Médiateurs lipidiques (les métabolites de l'acide arachidonique)	<ul style="list-style-type: none"> • Rôle essentiel dans la perméabilité vasculaire, l'attraction et l'activation des polynucléaires. 	<ul style="list-style-type: none"> • Henrotin <i>et al.</i>, 2001.
Fractions du complément	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Facilitent la phagocytose et la lyse des micro-organismes pathogènes. ➤ Activent les neutrophiles et la formation de formes activées de l'oxygène. ➤ Stimulent la libération de l'histamine des polynucléaires basophiles et des mastocytes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Jagels <i>et al.</i>, 2000. • Williams <i>et al.</i>, 1988.
Métalloprotéase	➤ Responsables de la dégradation des tissus de l'organe lésé.	<ul style="list-style-type: none"> • Gaudin <i>et al.</i>, 1998.



Annexe II : Structures chimiques des composés phénoliques de fruits de *Pistacia lentiscus* (Longo *et al*, 2007).



Annexe III : Structures chimiques des polyphénols de fruits de *Pistacia lentiscus* (Abdelwahed A *et al.*, 2006).

Annexe IV : Quelques méthodes d'études de l'activité anti-inflammatoire, *in vivo*.

Méthodes, <i>in vivo</i>	Principe de la méthode	Référence
Induction d'œdème	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Repose sur la capacité des agents anti-inflammatoires testés à inhiber l'œdème produit chez les souris soit au niveau de la patte postérieure ou l'oreille après injection d'un agent phlogistique. ➤ De nombreux agents phlogistiques ont été utilisés tel que : les levures de bière, le dextrane, les polysaccharides sulfatés comme la carragénine, l'histamine et la sérotonine, la koaline et le blanc d'œuf. La poudre de verre et le brûlage chaud sont également utilisés pour produire un gonflement local. 	<ul style="list-style-type: none"> • Naik et Sheth, 1976.
Induction d'une perméabilité vasculaire accrue	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Induite par l'acide acétique qui provoque la libération des médiateurs inflammatoires. ➤ Un modèle expérimentale typique pour évaluer l'effet des substances naturelles ou synthétiques sur la phase exsudative de l'inflammation aiguë. 	<ul style="list-style-type: none"> • Okoli et al., 2007.
Induction d'une pleurésie	<ul style="list-style-type: none"> ➤ C'est une inflammation aiguë induite chez le rat par injection de la λ-carrageenane, largement utilisé pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents. ➤ La λ-carrageenane stimule la libération de l'histamine et de la sérotonine par les mastocytes, débutant par cela une cascade d'événements qui produisent d'autres médiateurs qui contribuent à l'établissement de la réaction inflammatoire aiguë. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cuzzocrea et al., 1998. • Cuzzocrea et al., 1998 ; Jilroy et al., 1999.
Essai d'érythème	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Induit par la lumière ultraviolette, elle donne une image de la réponse aiguë des blessures qui est évaluée par l'érythème et l'augmentation locale de la température. 	<ul style="list-style-type: none"> • Naik et Sheth, 1976.
Modèles de granulomes	<ul style="list-style-type: none"> ➤ A été utilisé pour le dépistage des médicaments antiarthritiques. ➤ Permet d'étudier en détail le processus d'inflammation du point de vue de la pathophysiologie et de l'approche thérapeutique. ➤ Il existe deux modèles de granulome qui ont été largement utilisés, implantation de granulés de coton et poche granulomatique. 	<ul style="list-style-type: none"> • Selye, 1953. • Wilhelm, 1966. • Shen, 1967. • Winter et Portar, 1957.

Annexe V : Quelques méthodes d'études de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*.

Méthodes, <i>in vitro</i>	Principe de la méthode	Référence
Dénaturation des protéines	<ul style="list-style-type: none"> • A été employée comme méthode de dépistage, <i>in vitro</i>, pour les agents antiphlogistiques par Mizushima et ses collègues. • Grant et al. (1970) ont également confirmé leur travail et ont signalé que les médicaments anti-inflammatoires, inhibent la dénaturation des protéines. • La liaison des médicaments à l'albumine plasmatique peut inhiber la dénaturation thermique de l'albumine, il bloque peut-être les groupes $\text{O}^- \text{NH}_2$ dans le cas de l'histidine décarboxylase ou il déplace l'urate de l'albumine. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mizushima, 1964. • Mizushima et Kobayashi, 1968. • Skidmore et Whitehouse, 1965.
Action inhibitrices sur les protéinases	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les protéinases des leucocytes jouent un rôle important dans le développement de lésions tissulaires lors de réactions inflammatoires et un niveau de protection significatif a été fourni par des inhibiteurs de protéinase. 	<ul style="list-style-type: none"> • Govindappa et Poojashri, 2011.
Modèle des globules rouges humaines	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Les globules rouges sont utilisés comme modèle pour étudier l'inflammation car la membrane de l'érythrocytaire est analogue à la membrane du lysosome et sa stabilisation implique que l'extrait peut également stabiliser les membranes lysosomales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Chippada et al., 2011.

Annexe VI : Matériel du laboratoire

- Lecteur de Microplaque (BioTek ELx800).
- Spectro-photomètre (SHIMADZU).
- Balance de précision (RADWAG, Max=220g, d=0,001g).
- Balance analytique (Sartorius, Max=61g, d=0,1mg).
- Bain marie (Memmert).
- Etuve (Memmert).
- Incubateur (BOECO Germany).
- Centrifugeuse (Sigma).
- Agitateur électromagnétique (VELP).

- pH mètre (HANNA).
- Micropipettes.
- Eprouvettes.
- Erlenmeyers.
- Spatules.
- Béchers.
- Entonnoirs.
- Tubes à essais.
- Eppendorfs.
- Microplaques.
- Mortier en porcelaine

Annexe VII : Produits chimiques

- Sodium Dihydrogenphosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (RECTAPUR).
- di-Sodium Hydrogénophosphate anhydre (Na_2HPO_4) (Panreac).
- Chlorure du sodium (NaCl) (SIGMA-ALORICH).
- Diclofénac sodique (votrex).
- ABTS 2,2'-Azino-bis (acide 3éthylbenzothiazoline6-sulfonique) (SIGMA).
- DPPH (1.1-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl) (SIGMA).
- Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$) (BIOCHEM Chemopharma).
- Ethanol (SIGMAALORICH).
- Méthanol (BIOCHEM).

Résumé

Pistacia lentiscus L, est une plante utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de pathologies inflammatoires. Cette étude avait pour objectif d'investiguer l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et ethanolique des fruits de *P. lentiscus*, en utilisant la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges. L'extrait ethanolique et aqueux des fruits de *P. lentiscus* présentent un pourcentage de stabilisation membranaire du globule rouges de 79.65% à la concentration 100µg/mL et 59.84% à la concentration 70µg/mL, respectivement, des effets relativement élevé par rapport au Diclofénac sodique (62.10 % à 200 µg/mL) et comparable à l'acide gallique qui a présenté un pourcentage de 58.65 % à 30 µg/mL. Les concentrations ayant exhibé l'effet anti-hémolytique ne présente aucune toxicité, vis-à-vis, du globule rouge. De plus, le pouvoir antioxydant des extraits ethanolique et aqueux du fruit de *P. lentiscus* (IC₅₀ entre 8 et 13 µg/mL) pourrait contribuer dans l'activité anti-inflammatoire. Cette étude fournit un support pour l'utilisation du fruit de *P. lentiscus* dans le traitement des désordres lié à l'inflammation.

Mots clés : *Pistacia lentiscus* ; activité anti-inflammatoire ; stabilisation membranaire ; Diclofénac sodique ; acide gallique ; globule rouge.

Abstract

Pistacia lentiscus L, is a plant widely used in traditional medicine for the treatment of various inflammatory pathologies. The objective of this study was to investigate the anti-inflammatory activity of aqueous and ethanolic extracts of *P. lentiscus* fruit, using the method of red blood cells membrane stabilization. The fruits ethanolic and aqueous extract of *P. lentiscus* have a membrane stabilizing effect of 79.65% at 100 µg/mL and 59.84% at 70 µg/mL, respectively. Extracts activity were relatively higher than Diclofenac sodium (62.10% to 200 µg/mL) and comparable to gallic acid which showed a percentage of 58.65% at 30 µg/mL. The concentrations exhibiting the anti-hemolytic effect showed no toxicity, toward the red blood cells. Moreover, the antioxidant power of the tested ethanolic and aqueous extracts (IC₅₀ between 8 and 13 µg/mL) could contribute in the anti-inflammatory activity. This study provides a support for the use of *P. lentiscus* fruit in the treatment of inflammatory related disorders.

Key words: *Pistacia lentiscus*; anti-inflammatory activity; membrane stabilization; Diclofenac sodium; gallic acid. red blood cell.