

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE FERHAT ABBES SETIF

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de Biochimie

Mémoire

**Présenté par
SAIDI Asma**

Pour l'obtention du titre de

MAGISTER en BIOCHIMIE

Option: Biochimie et Physiologie Expérimentale

THEME

**Effets des extraits de *Pistacia lentiscus* L. sur
l'activité de l'élastase et sur le chimiotactisme
des neutrophiles humains activés**

Soutenu le 19/06/2012 devant le jury :

Président:	Pr. BOURICHE Hamama	Professeur	U.F.A Sétif
Rapporteur:	Pr. SENATOR Abderrahmane	Professeur	U.F.A Sétif
Examineurs:	Pr. HOUCHER Bakhouche	Professeur	U.F.A Sétif
	Pr. KHATTABI Soumia	Professeur	U.F.A Sétif

2011/2012

Remerciements

Louange au Dieu le tout puissant qui m'a accordé la foi, le courage et la patience pour mener ce travail à terme.

*Je tiens à remercier infiniment Pr. **SENATOR Abderrahmane** pour m'avoir proposé ce sujet de mémoire, pour sa patience et ses conseils précieux. Permettez-moi Mr de vous exprimer mes remerciements les plus sincères pour votre encadrement scientifique.*

*Mes plus sincères remerciements vont également au Pr. **BOURICHE Hamama** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ce mémoire et accepté de juger ce modeste travail ainsi que pour son soutien et ses conseils judicieux*

*Je remercie le Pr. **HOUCHER Bakhouche** et le Pr. **KHATTABI Soumia** pour accepter d'être membres de ce jury. Qu'ils reçoivent ici toute ma gratitude.*

Mes remerciements sont destinés aussi à tous les membres du laboratoire, surtout Melles Karnouf Nacima, Belambri Sahra Amel et Mme Boudoukha Chahra pour leur gentillesse et leur aide précieuse, m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à mes chers parents qu'ils
trouvent ici toutes mes gratitudes pour leur soutien tout
au long de ma vie et mes études*

A mes sœurs et frères ainsi qu'à mes amies

Résumé

Les plantes médicinales à propriétés anti-inflammatoires sont utilisées afin d'éviter les nombreux effets néfastes associés aux anti-inflammatoires synthétiques. De nombreuses investigations indiquent que les activités anti-inflammatoires des plantes pourraient être attribuées à leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Dans la présente étude, la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes a été estimée pour les extraits méthanoliques (E-Met) des feuilles et des fruits et de l'extrait aqueux (E-AQ) des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Ces extraits semblent avoir des taux différents en ces molécules bioactives. Par ailleurs, l'effet anti-inflammatoire de 3 extraits a été étudié *in vitro* sur le chimiotactisme des neutrophiles humains activés par l'fMLP. Nos résultats montrent que l'E-AQ et E-Met des feuilles inhibent le chimiotactisme d'une manière dose-dépendante avec des IC₅₀ de 34.6± 0.5 et 26.7± 0.7µg/ml, respectivement. Cependant, l'E-Met des fruits donne l'effet anti-chimiotactique le plus fort avec IC₅₀ de 19.8 ± 0.8µg/ml. En outre, nous avons évalué l'effet inhibiteur de ces extraits sur l'activité de l'élastase leucocytaire. Dans ce contexte, l'E-AQ et l'E-Met des feuilles et l'E-Met des fruits à 100µg/ml inhibent complètement l'activité élastasique de 82%, 90% et 94%, respectivement. En effet, l'E-Met des feuilles (IC₅₀ de 11.5± 0.2µg/ml) et celui des fruits (IC₅₀ de 10.7± 0.7µg/ml) présentent un pouvoir inhibiteur très importants et dose-dépendant sur l'élastase leucocytaire, tandis que l'E-AQ des feuilles inhibe fortement l'élastase (IC₅₀ de 13.7± 0.4µg/ml) mais moins important que les extraits méthanoliques. En conclusion, *P. lentiscus*, et surtout ses fruits, possède des capacités anti-chimiotactiques et anti-élastasique très importantes. En effet cette plante peut être considérée comme une source naturelle de molécules bioactives, douées d'activité anti-inflammatoire, ce qui supportent son usage traditionnel.

Mots clés: Neutrophile, Chimiotactisme, Elastase leucocytaire, *Pistacia lentiscus*.

ملخص

تستعمل النباتات الطبية ذات الفعل المضاد للالتهابات بهدف تجنب التأثيرات الجانبية المرافقة لمضادات الالتهاب المصنعة. أكدت العديد من الدراسات أن الفعل المضاد للالتهابات للنباتات راجع إلى احتوائها على عديدات الفينول والفلافونويدات. تمّ في هذه الدراسة تقدير محتويات مستخلصات نبتة *Pistacia lentiscus* [مستخلصات الميثنول (E-Met) للأوراق و الثمار بالإضافة للمستخلص المائي للأوراق (E-AQ)] من عديدات الفينول والفلافونويدات، حيث أظهرت هذه المستخلصات معدلات متفاوتة من عديدات الفينول والفلافونويدات. تمّت من ناحية أخرى، دراسة الفعل المضاد للالتهابات للمستخلصات الثلاث على الهجرة الموجهة للخلايا المتعادلة والتي تم تحفيزها بعامل الجذب fMLP. أين بينت النتائج أنه لكل من E-Met و E-AQ للأوراق تأثيراً مثبطاً معتبراً ($P < 0.5$) متعلقاً بالتركيز، حيث قدرت التراكيز IC_{50} بـ 0.5 ± 34.6 و 0.7 ± 26.7 ميكروغرام/ملل، على التوالي. في حين أن E-Met للثمار أظهر أعلى فعل مضاد للهجرة نحو لـ fMLP ($IC_{50} = 0.8 \pm 19.8$ ميكروغرام/ملل). كما تم اختبار تأثير E-AQ ، E-Met للأوراق و E-Met للثمار على نشاط elastase. حيث أكدت النتائج الفعل التثبيطي المباشر على elastase والمعتبر لهذه المستخلصات عند 100 ميكروغرام/ملل و بنسبة 82%، 90% و 94%، على التوالي. E-Met لكل من الأوراق ($IC_{50} = 0.2 \pm 11.5$ ميكروغرام/ملل) و الثمار ($IC_{50} = 0.7 \pm 10.7$ ميكروغرام/ملل) أظهرت فعلاً تثبيطياً هاماً لنشاط elastase. E-AQ هو الآخر تثبط نشاط elastase ($IC_{50} = 0.4 \pm 13.7$ ميكروغرام/ملل) و لكن بفعالية أقل. بينت الدراسة أن *P. lentiscus*، وخصوصاً ثمارها، لديها قدرات هامة مضاد للهجرة الموجهة و مثبّطة لـ elastase. و من ذلك، يمكن اعتبار هذه النبتة مصدراً طبيعياً للجزيئات الحيوية النشطة التي تدعم استخداماتها التقليدية.

الكلمات المفتاحية: الخلايا المتعادلة، الهجرة الموجهة، Elastase ، *Pistacia lentiscus*.

Summary

The medicinal plants with their anti-inflammatory properties are used to avoid the many undesirable effects which are associated with synthetic anti-inflammatory drugs. Many investigations clearly indicated that the anti-inflammatory activities of plants could be attributed to their contents in polyphenols and flavonoids. In this study, the content, in polyphenols and flavonoids, was estimated for the methanolic extracts (E-Met) of leaves and fruits with the aqueous extract (E-AQ) of leaves of *Pistacia lentiscus*. The results demonstrated that extracts had a high content in phenolic compounds and flavonoids. In addition, the anti-inflammatory effect of *P. lentiscus* extracts, particularly chemotaxis was evaluated *in vitro* on human neutrophils which were activated by fMLP. Our results showed that E-AQ and E-Met of leaves inhibited the chemotaxis response with an IC₅₀ of 34.6± 0.5 and 26.7± 0.7µg/ml, respectively. However, the E-Met of fruits showed the highest anti-chimiotactic effect with an IC₅₀ of 19.8± 0.8µg/ml. Moreover, the inhibition effect of these extracts on elastase activity was evaluated. Both E-AQ and E-Met of leaves and E-Met of fruits extracts at 100µg/ml exhibited a high elastase inhibitory effect which was estimated by 82% 90% and 94%, respectively. In fact, that makes it possible to prove that E-Met of both leaves (IC₅₀ of 11.5± 0.2µg/ml) and fruits (IC₅₀ of 10.7 ± 0.7µg/ml) presented an important inhibition. Meanwhile, aqueous extract of the leaves showed a moderate anti-elastasic effect (IC₅₀ de13.7± 0.4µg/ml). In conclusion, *P. lentiscus*, and especially its fruits, have an important anti-chimiotactic and anti-elastase capacities. Indeed, this plant can be considered as a natural source of the bioactive molecules which support it traditional use.

Key words: Neutrophil, Chemotaxis, Elastase, *Pistacia lentiscus*.

LISTE DES ABREVIATIONS

- α_1 -AP: Alpha1-antitrypsin
- CB: Cytochalasine B
- E-AQ: Extrait aqueux
- ELA2* : Elastase neutrophil gene 2
- E-Met: Extrait méthanolique
- E-Selectins: Endothelial cell selectins
- fMLP: formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
- FPRs: *formyl*-peptide receptors
- G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor.
- HNE: Human neutrophil elastase
- ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1
- IgG: Immunoglobulines G
- IL-2: Interleukine 2
- IL-6: Interleukine 6
- IL-8: Interleukine 8
- LFA-1: Lymphocyte-associated function antigen
- LPS: Lipopolysaccharid
- L-Selectins: Leukocyte selectins
- LTB4: Leukotriene B4
- Mac-1: Macrophage antigen
- PMNs: Polymorphonuclear neutrophils.
- P-Selectins: Platelet selectins
- SLPI: Secretory leucocyte peptidase inhibitor
- TGF: Transforming growth factor
- TLR: Toll-like receptor
- TNF- α : Tumor necrosis factor- α

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1.** Micrographe électronique du neutrophile mature.
- Figure 2.** Facteurs de croissance induisant la différenciation des cellules sanguines.
- Figure 3.** Etapes de la migration des neutrophiles activés à travers la paroi endothéliale vasculaire.
- Figure 4.** Adhésion ferme-signal dépendante du neutrophile.
- Figure 5.** Polarisation orientée du neutrophile en réponse au gradient de l'fMLP.
- Figure 6.** Mécanisme et voie de signalisation de phagocytose au sein du neutrophile.
- Figure 7.** Modèle SNAREs expliquant la libération des granules du neutrophile.
- Figure 8.** Système NADPH oxydase et génération des ROS par les neutrophiles stimulés.
- Figure 9.** Diagramme structural de la forme pré-proprotéase de l'élastase leucocytaire.
- Figure 10.** Structure tertiaire de l'élastase leucocytaire et son site actif.
- Figure 11.** Photographies de *Pistacia lentiscus*.
- Figure 12.** Chromatogramme correspondant à l'extrait épuré des fruits de *P. lentiscus*.
- Figure 13.** Protocoles d'extraction au milieu aqueux et au milieu méthanolique des feuilles et des fruits de *P. lentiscus*.
- Figure 14.** Chambre de chimiotactisme.
- Figure 15.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.
- Figure 16.** Courbe d'étalonnage de la quercétine.
- Figure 17.** Adhésion des neutrophiles humains sur le filtre après leur migration.
- Figure 18.** Effet chimioattractant de l'fMLP sur les PMNs humains isolés.
- Figure 19.** Effet des extraits méthanoliques de *P. lentiscus* sur le chimiotactisme des neutrophiles humains activés par l'fMLP.
- Figure 20.** Effet des extraits des feuilles de *P. lentiscus* sur le chimiotactisme des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP.
- Figure 21.** IC₅₀ des extraits de *P. lentiscus* durant la migration des neutrophiles humains stimulés par l'fMLP.
- Figure 22.** Effet des extraits de *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase leucocytaires.
- Figure 23.** Comparaison entre l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles de *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase leucocytaire.
- Figure 24.** Comparaison entre les effets inhibiteurs d'extraits méthanoliques des fruits et des feuilles de *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase leucocytaire.
- Figure 25.** IC₅₀ des trois extraits de *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase leucocytaire.
- Tableau 1.** Flavonoïdes dans 4 espèces de *Pistacia*.
- Tableau 2.** Quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits de *P. lentiscus*.

Sommaire

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Polynucléaires neutrophiles	1
1.1. Source et maturation.....	2
1.2. Granules du neutrophile.....	3
2. Fonctions du neutrophile	4
2.1. Migration	4
2.1.1. Marginalisation et adhésion de roulement de neutrophiles aux parois vasculaires	5
2.1.2. Adhésion ferme du neutrophile sur l'endothélium vasculaire.....	5
2.1.3. Migration trans-endothéliale (diapédèse).....	6
2.1.4. Migration tissulaire du neutrophile (Chimiotactisme)	7
2.1.5. Mécanisme du chimiotactisme du neutrophile	8
2.1.6. Voies de signalisation du chimiotactisme de neutrophiles stimulés par l'fMLP	8
2.2. Phagocytose	10
2.3. Dégranulation.....	11
2.4. Libération des médiateurs pro-inflammatoires	12
2.5. Flambée respiratoire	12
3. Elastase leucocytaire	14
3.1. Structure de l'élastase leucocytaire	14
3.2. Substrats spécifiques de l'élastase leucocytaire	16
3.3. Inhibiteurs endogènes de l'élastase leucocytaire.....	17
3.4. Inhibiteurs synthétiques de l'élastase leucocytaire.....	17
3.5. Effets délétères de l'élastase leucocytaire.....	18
4. <i>Pistacia lentiscus</i> L.	19
4.1. Distribution géographique	19
4.2. Nomenclature et classification botanique	19
4.3. Description botanique.....	19
4.4. Composition chimique de <i>P. lentiscus</i>	21
4.5. Usage traditionnel et activités biologiques de <i>P. lentiscus</i>	22

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	25
1.1. Matériel biologique	25
1.2. Matériel végétal.....	25
1.3. Solutions du travail.....	25

2. Méthodes	26
2. 1. Extraction.....	26
2. 2. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes de <i>P. lentiscus</i>	28
2. 2. 1. Dosage des composés phénoliques	28
2. 2. 2. Dosage des flavonoïdes.....	28
2. 3. Préparation des cellules	28
2. 3. 1. Isolement des neutrophiles	28
2. 3. 2. Comptage des PMNs	29
2. 3. 3. Viabilité et pureté des PMNs.....	29
2. 3. 4. Cytotoxicité des extraits de <i>P. lentiscus</i>	30
2. 4. Effet des extraits de <i>P. lentiscus</i> sur le chimiotactisme <i>in vitro</i>	30
2. 5. Effets des extraits de <i>P. lentiscus</i> sur l'activité de l'élastase	31
2.6. Analyse statistique.....	32

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Préparation des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	34
2. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes	35
3. Préparation des neutrophiles humains	38
3.1. Effet Cytotoxique des extraits de <i>P. lentiscus</i>	38
4. Etude du chimiotactisme des neutrophiles humains.....	38
4.1. Effet des extraits méthanoliques de <i>P. lentiscus</i> sur le chimiotactisme	40
4.2. Effet des extraits des feuilles de <i>P. lentiscus</i> sur le chimiotactisme	40
5. Etude de l'activité de l'élastase leucocytaire	44
5.1. Effet des extraits de <i>P. lentiscus</i> sur l'activité de l'élastase	45
CONCLUSION.....	49

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques.....	51
---	-----------

INTRODUCTION

Les polynucléaires neutrophiles constituent la première barrière de défense de l'immunité innée et participent efficacement dans la réaction inflammatoire contre toute sorte d'agression. En effet, les neutrophiles migrent vers le site affecté par chimiotactisme et englobent les agents pathogènes par phagocytose. Ces phagocytes semblent avoir un bagage extraordinaire des substances microbicides et des hydrolases. Principalement, l'élastase, avec une large spécificité des substrats, est libérée afin d'hydrolyser et de tuer l'envahisseur phagocyté.

L'accumulation prolongée et irrégulière des neutrophiles dans le site affecté et leurs activités cytotoxiques ainsi que la dégranulation excessive de l'élastase, qui peut échapper aux systèmes de régulation, peuvent induire des dommages et des lésions tissulaires irréversibles, contribuant ainsi à l'apparition des maladies inflammatoires graves.

Les anti-inflammatoires et les inhibiteurs anti-élastasiques synthétiques, utilisés contre cette dérégulation du fonctionnement du neutrophile, présentent des effets secondaires néfastes sur l'organisme. En effet, des recherches récentes dans le domaine de la phytothérapie n'ont fait que confirmer le bien fondé des vertus anti-inflammatoires des plantes médicinales, anciennement utilisées de façon empirique.

Dans la présente étude, nous avons évalué, *in vitro*, les effets des extraits des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* sur les neutrophiles humains isolés. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement de leur action sur le chimiotactisme des neutrophiles activés et sur l'activité enzymatique de l'élastase leucocytaire, suite à une stimulation par l'fMLP.

1. Polynucléaires neutrophiles

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) appartiennent au sous-groupe des granulocytes. Ils ont une taille moyenne de 10 à 14µm et se caractérisent par un noyau polylobé de 2 à 5 lobes (Fig. 1). Les neutrophiles comportent dans leur cytoplasme de fines granulations qui fixent les colorants neutres, à la coloration au May Grünwald Giemsa d'où leur dénomination. Tandis que, les granules du polynucléaire éosinophile ont la propriété de fixer l'éosine acide et que ceux du polynucléaire basophile fixent les colorants basiques. Les neutrophiles sont très abondants et représentent plus de 95% du sous-groupe des granulocytes. D'ailleurs, les PMNs constituent la plus importante population leucocytaire de 60 à 70% soit 5400 cellules/µl dans la circulation sanguine (Mashima, 1996).

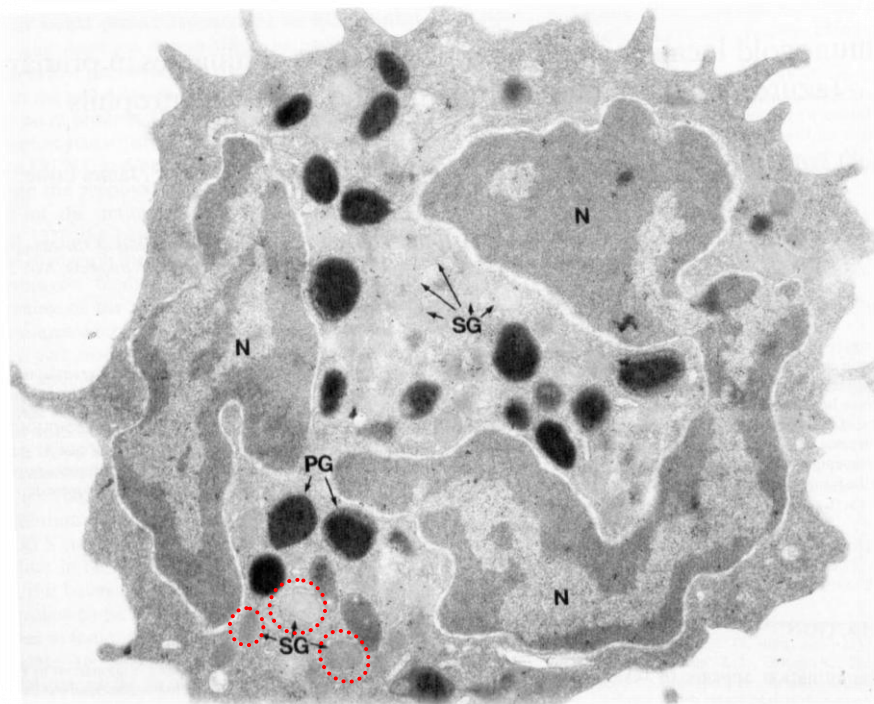


Figure 1. Micrographie électronique du neutrophile mature. Le neutrophile est caractérisé par un noyau multilobé (N) et un cytoplasme riche en granules tels que les granules primaires (PG) et les granules secondaires, SG (László *et al.*, 1991).

1.1. Source et maturation

Dans la moelle osseuse, les polynucléaires neutrophiles sont développés d'une cellule souche pluripotente médullaire qui donne naissance aux différentes lignées cellulaires. De la lignée myéloïde, Dix milliards des cellules sont produites chaque jour dans le processus de l'hématopoïèse. Pour atteindre leur maturation, les PMNs prennent environ 14 jours de temps nécessaire pour la différenciation des cellules pro-génitrices, les myéloblastes, en neutrophiles mature. les myéloblastes passent dans la phase mitotique qui dure environ une semaine, pour se différencier en promyélocytes, puis en myélocytes où la prolifération de ces cellules pro-génitrices est en réponse aux nombreux facteurs de croissance (Fig. 2), principalement le G-CSF *granulocyte colony-stimulating factor* (Semerad *et al.*, 2002) et le GM-CSF *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor* (Baumann *et al.*, 2005).

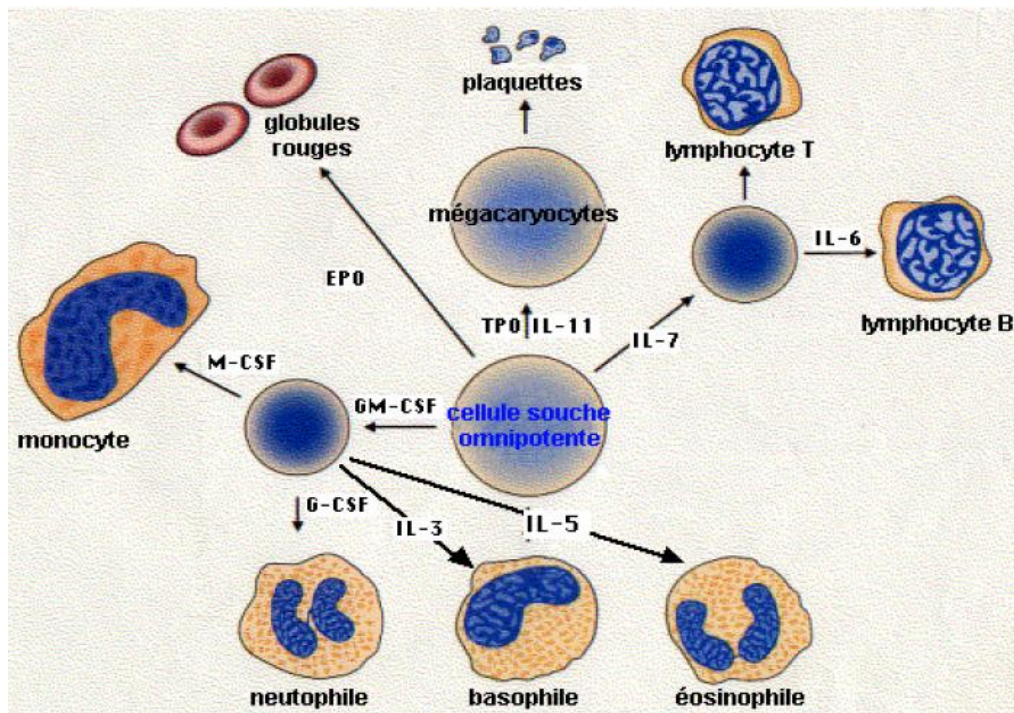


Figure 2. Facteurs de croissance induisant la différenciation des cellules sanguines. Les neutrophiles proviennent d'une cellule souche hématopoïétique. Cette cellule souche pluripotente commence à se différencier sous l'effet des facteurs de croissance tels que GM-CSF et G-CSF menant aux polynucléaires neutrophiles matures qui quittent la moelle osseuse et se mobilisent vers la circulation sanguine lors qu'ils vont être stimulés.

Jusqu'au stade de promyélocyte, les cellules polynucléaires ne possèdent pas de granulations spécifiques et on ne peut pas distinguer morphologiquement les lignées granuleuses entre elles (myéloblastes, promyélocytes, éosinophiles et basophiles). Suite de la phase mitotique, le métamyélocyte se différencie en polynucléaire neutrophile mature caractérisé par son noyau polylobé. Après cette maturation médullaire, les PMNs résident dans le compartiment myélopoïétique de la moelle osseuse.

Lors qu'une réaction inflammatoire est mise en place, les neutrophiles matures quittent la moelle osseuse et passent dans la circulation sanguine. Dans le sang, les neutrophiles ont une demi-vie de 6 à 10 heures s'ils ne sont pas recrutés au site enflammé. En réponse aux stimuli inflammatoires, les PMNs quittent la circulation sanguine et migrent dans les tissus périphériques pour gagner le site inflammatoire et ils ne ré-circulent plus après leur sortie des vaisseaux sanguins. Dans ce cas, ils peuvent survivre jusqu'à quelques jours afin d'accomplir leur approche durant l'inflammation (Martin *et al.*, 2003).

1.2. Granules du neutrophile

L'une des particularités du neutrophile est sa compartimentation. Au repos, les molécules «prêtes à l'usage» sont stockées dans des compartiments distingués au sein de la cellule. Ces compartiments sont classifiés en granules azurophiles (primaires), granules spécifiques (secondaires), granules à gélatinase (tertiaires), lysosomes et vésicules sécrétoires (Borregaard et Cowland, 1997).

Dans les promyélocytes, les granules primaires contenant des hydrolases acides et des protéases neutres s'apparaissent dont leur contenu va jouer un rôle majeur dans la réaction inflammatoire et la lutte bactérienne après leur libération (Gullberg *et al.*, 1999; Lacy, 2005). Au stade de la maturation des myélocytes, les granules spécifiques sont identifiés par leur contenu en phosphatase alcaline et en lactoferrine. Ils comportent également des molécules essentielles aux fonctions de neutrophile telles que les β 2-intégrines (CD11b/CD18) et le cytochrome b_{558} , le constituant membranaire du système NADPH oxydase (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999; Faurschou et Borregaard, 2003). Ensuite, les granules tertiaires sont formés dans les métamyélocytes. Ils se distinguent, des précédents, par leur contenu en gélatinase et en molécules impliquées dans les mécanismes d'adhésion des neutrophiles et de leur migration trans-endothéliale (Mollinedo *et al.*, 1993; Faurschou et Borregaard, 2003). Enfin, les vésicules sécrétoires sont créées par le processus d'endocytose et apparaissent plus tardivement à la fin de la maturation du neutrophile. Ces vésicules constituent un réservoir d'une variété de récepteurs membranaires et de molécules d'adhérence tels que β 2-intégrines, le récepteur de fMLP et celui de *lipopolysaccharid* (LPS), les produits de bactéries infectieuses (Gougerot-Pocidallo et Halbwachs-Mecarelli, 2005; Borregaard *et al.*, 2007).

2. Fonctions du neutrophile

Les neutrophiles exhibent des fonctions anti-infectieuses par lesquelles empêchent la croissance et la propagation des microbes pathogènes. Leur capacité est étroitement liée aux nombreuses activités spécifiques, y compris l'adhérence aux parois endothéliales vasculaires, le chimiotactisme, la phagocytose, la dégranulation et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (Johansson *et al.*, 2002).

2.1. Migration

Le recrutement des neutrophiles de la circulation sanguine vers le site enflammé est un événement fondamental dans la réaction inflammatoire. Il débute par une adhésion réversible des PMNs, dite de roulement, le long de la paroi vasculaire. Ce roulement s'achève par une adhésion ferme. Les PMNs stimulés se positionnent alors pour traverser la paroi vasculaire et passer vers le milieu interstitiel, phénomène nommé diapédèse (Fig. 3). Arrivés au milieu extravasculaire, les PMNs vont migrer par chimiotactisme vers le foyer inflammatoire, guidés par un gradient des chimioattractants (Artoli *et al.*, 2007).

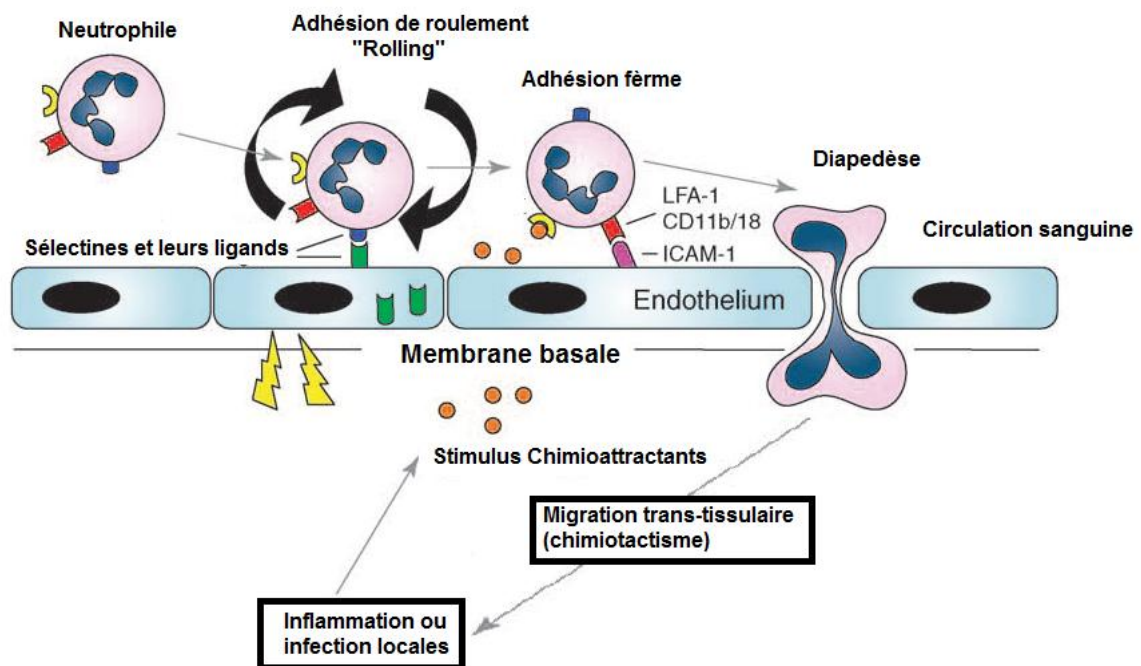


Figure 3. Etapes de la migration des neutrophiles activés à travers la paroi endothéliale vasculaire. Nombreuses molécules d'adhérence sont exprimées à la surface du neutrophile et de l'endothélium des veinules post-capillaires à la suite de leur exposition aux médiateurs pro-inflammatoires. Parmi ces molécules qui aident à l'interaction neutrophile-endothélium, les L, P, E-sélectines, les β_2 - intégrines (LFA-1 et Mac-1) et leur récepteur endothélial, ICAM-1 (Guo et Ward, 2002; Theilgaard-Mönch *et al.*, 2006).

2.1.1. Marginalisation et adhésion de roulement de neutrophiles aux parois vasculaires

La réponse inflammatoire implique initialement des changements de la microcirculation sanguine proche du tissu affecté. Ces changements mènent à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et au ralentissement du débit sanguin local. Ces événements permettent, dans un premier temps, la marginalisation des PMNs, habituellement circulants au centre du vaisseau (Granger et Kubes, 1994).

Durant la marginalisation, les PMNs entrent en contact réversibles avec les cellules endothéliales le long de la paroi vasculaire *via* des interactions adhésives de faible-affinité. En outre, les globules rouges exercent une force dynamique sur les leucocytes marginalisés conduisant de ce fait au mouvement de rotation des neutrophiles, un processus dit adhésion de roulement (Lotufo *et al.*, 2001; Sun et Munn, 2006). L'adhésion de roulement de PMNs sur l'endothélium vasculaire s'effectue par l'intermédiaire des molécules d'adhérence appartenant à la famille des sélectines (Artoli *et al.*, 2007; Krasik *et al.*, 2008). Trois types de sélectines sont impliqués dans l'adhésion réversible, L-sélectines ou LECAM-1, P-sélectines ou ICAM-1 et E-sélectines ou VCAM-1 (Gougerot-Pocidallo et Halbwegs-Mecarelli, 2005).

Selon le site enflammé, les médiateurs pro-inflammatoires servent d'activer les cellules endothéliales menant rapidement à leur expression accrue de P-sélectines, qui est suivie dans quelques heures par une expression élevée d'E-sélectines (Lunn et Hurley, 2009). Les P- et E-sélectines vont interagir d'abord avec les ligands d'adhérence qui présentent des résidus oligosaccharides α -2.3-sialylé et α -1.3-fucosylé, reconnus par le sialyl de Lewis x, S-Le^x. Les principaux ligands sont le dimère PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) et les L-sélectines, qui sont constitutivement exprimés à la surface des PMNs (Guo et Ward, 2002; Zen *et al.*, 2007).

2.1.2. Adhésion ferme du neutrophile sur l'endothélium vasculaire

Dans un deuxième temps, les neutrophiles adhérents sont activés par différents médiateurs dérivés de l'endothélium, en particulier l'IL-8, le PAF et la LTB₄ (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999). Cette activation est caractérisée par la disparition rapide des L-sélectines de la surface du neutrophile. Parallèlement, l'expression et l'affinité des β ₂-intégrines leucocytaires, notamment *macrophage antigen* Mac-1 (CD11b/CD18) et *lymphocyte-associated function antigen* LFA-1 (CD11a/CD18), vont être augmentées (Gougerot-Pocidallo *et al.*, 2006; Gaborski *et al.*, 2008). En effet, les PMNs activés sont immobilisés (Fig. 4) grâce des interactions de plus forte affinité établies entre les intégrines et les *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) et probablement VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*), menant à

l'adhésion ferme du neutrophile sur l'endothélium vasculaire (Guo et Ward, 2002; Krasik *et al.*, 2008). Cette adhésion ferme est une étape cruciale et nécessaire à la transmigration dans l'espace extravasculaire vers l'agent infectieux.

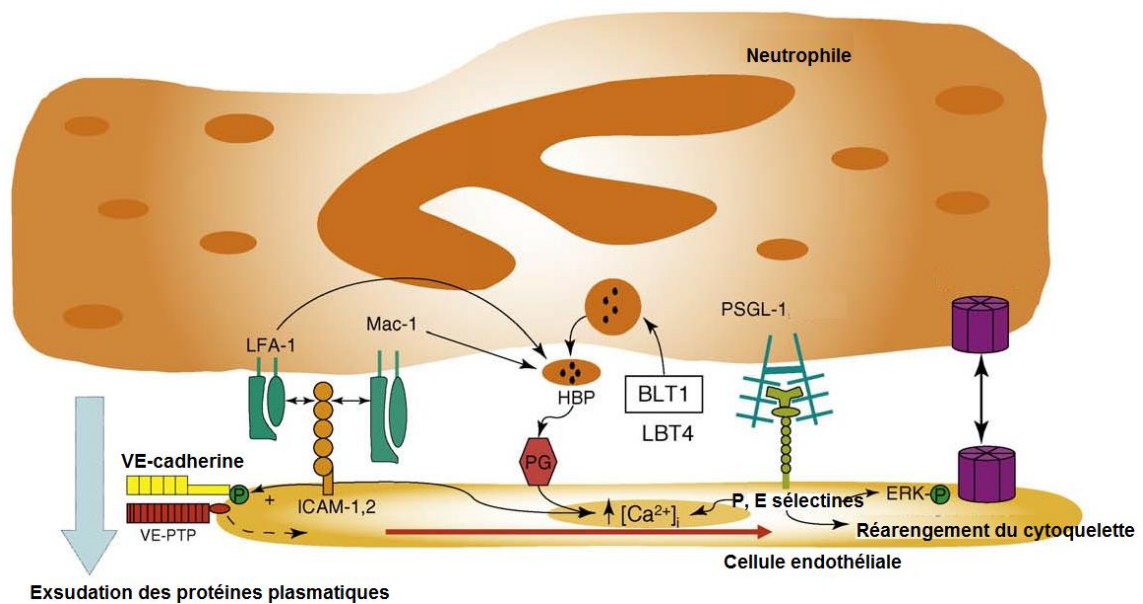


Figure 4. Adhésion ferme-signal dépendante du neutrophile. Sous l'effet des médiateurs solubles sécrétés par l'endothélium stimulé, l'adhésion ferme et les interactions de β_2 -intégrines (LFA-1 et Mac 1) avec leur ligands endothéliaux (ICAM-1,-2) et les P, L sélectines avec le PSGL-1 sont établies. L'adhésion ferme peut augmenter la perméabilité vasculaire en déclenchant la mobilisation du Ca^{2+} endothélial *via* plusieurs voies de signalisation en menant finalement à la réorganisation du cytosquelette au sien des cellules endothéliales (DiStasi et Ley, 2009).

2.1.3. Migration trans-endothéliale (diapédèse)

De nombreux facteurs solubles importés du site affecté sont connus par leur capacité d'augmenter la perméabilité vasculaire et d'activer séquentiellement l'expression des molécules d'adhérence et leurs ligands, en agissant à la fois sur les neutrophiles et l'endothélium, parmi lesquels la thrombine, la bradykinine, l'histamine, les facteurs de croissance, l'IL-8 et le TNF- α . En effet, Ces facteurs se lient à leurs récepteurs membranaires endothéliaux et provoquent la contraction de ces cellules et la perturbation de l'intégrité des jonctions inter-endothéliales (Mehta et Malik, 2006).

Le neutrophile dévie alors sa forme sphérique par l'aplatissement contre les cellules endothéliales et prolonge un pseudopode dans la jonction des cellules endothéliales. Ceci est suivi par le glissement du PMN entre les cellules endothéliales, dans un processus connu par la diapédèse (Tözere et Ley, 1992). Le contact endothélium-neutrophile, durant la diapédèse, fait intervenir des interactions homotypiques PECAM-1-PECAM-1 qui sont exprimées, à la fois, sur la jonction endothéliale et les PMNs stimulés (Guo et Ward, 2002; DiStasi et Ley, 2009).

2.1.4. Migration tissulaire du neutrophile (Chimiotactisme)

Le chimiotactisme est défini comme étant le mouvement orienté des cellules ou d'une organisation en réponse au gradient de chimioattractants. Ce déplacement est associé aux changements morphologiques produits dans les cellules à migrer (Xu *et al.*, 2003).

Après avoir glissé entre les cellules endothéliales, les neutrophiles orientés migrent dans les tissus vers le site inflammatoire à l'aide des molécules d'adhérence. Des anciennes études ont démontré que plusieurs substances chimioattractantes ont la capacité de moduler l'expression de certaines molécules d'adhérence à la surface du neutrophile, en particulier le fMLP qui augmente l'expression des β -intégrines (Lotufo *et al.*, 2001). En plus de l'expression des molécules d'adhérence, l'exposition du neutrophile au gradient de substances chimiotactiques déclenche sa polarisation où il perd sa forme sphérique de repos pour prendre une forme allongée polarisée. La polarisation des neutrophiles stimulés est indispensable pour la locomotion et la migration orientée. Devenant polaire (Fig. 5), le PMN présente un pseudopode (lamellipode) dans le bout antérieur et un uropode contractile au bout postérieur (Weiner, 2002; Xu *et al.*, 2003).



Figure 5. Polarisation orientée du neutrophile en réponse au gradient de l'fMLP. (A) Image du neutrophile non polarisé. (B) Répondant à l'agent chimioattractant, le neutrophile perd sa forme sphérique et prend la forme allongée polarisée après 80s. (C) Après 130s d'exposition au fMLP, le neutrophile polarisé présente un lamellipode, pointant dans la direction des concentrations les plus fortes du fMLP, et un uropode postérieur (Weiner, 2002).

Les PMNs se déplacent ensuite par des mouvements amiboïdes complexes et cycliques en étendant le lamellipode dans la direction du gradient chimiotactique et en rétractant simultanément son uropode postérieur. La vitesse d'un neutrophile peut atteindre 2,5mm par heure, soit deux à trois fois plus rapide que celle d'un monocyte (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999). Les mécanismes du mouvement sont complexes et font intervenir la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation de nombreuses voies de signalisation aboutissant à la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine (Weiner, 2002).

2.1.5. Mécanisme du chimiotactisme du neutrophile

Les interactions entre les protéines cytosquelettiques, principalement l'actine, sont responsables de fonctions fondamentales du neutrophile où elles interviennent dans la tension, la polarisation, la mobilité, la transduction du signal et la phagocytose (Florentinus *et al.*, 2011). L'actine se trouve sous deux formes, l'actine globulaire ou monomérique (actine-G) et l'actine filamenteuse (actine-F). Au cours du chimiotactisme, les actines-G se polymérisent en longs filaments d'actine-F au front du PMN. Les polymères d'actine-F nouvellement synthétisés sont associés à l'apparition d'une extension ou d'un pseudopode antérieur qui se déplace et propulse le corps cellulaire dans le sens de migration, tandis que la contraction du bord arrière permet l'attraction du neutrophile vers l'avant (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999; Pollard *et al.*, 2003).

L'adhésion *via* les intégrines fournit le moyen physique de cette traction. La force de traction est créée par les propriétés contractiles de la myosine II qui forme un réseau d'actinomyosine dans l'uropode de la cellule. La myosine II est ainsi localisée le long des régions latérales du neutrophile polarisé où elle augmente la tension contractile et prévient la formation des pseudopodes latéraux. En fin, le corps cellulaire se contracte grâce à la dépolymérisation de l'actine-F en actine-G et avance dans le sens du gradient de chimioattractant (Xu *et al.*, 2003; Sasawatari *et al.*, 2010). Le chimiotactisme du neutrophile dépend d'un remodelage rapide de l'actine cytosquelettique, *via* des cycles continus de polymérisation/ dépolymérisation. Ces cycles sont hautement régulés par les *actin binding proteins*, ABPs (Kamal *et al.*, 2007).

2.1.6. Voies de signalisation du chimiotactisme de neutrophiles stimulés par le fMLP

Durant l'infection, les neutrophiles sont exposés à des nombreux médiateurs pro-inflammatoires induisant des multiples voies de signalisation intracellulaire tous en passant de la notion récepteur-ligand dépendant. Ces voies sont traduites en plusieurs réponses physiologiques, en particulier le chimiotactisme. Ce processus correspond à la sensibilité des PMNs au gradient de chimioattractants, principalement le fMPL (Fauschou et Borregaard, 2003).

Le fMLP, un tri-peptide chimioattractant produit par *Escherichia coli.*, exhibe une flexibilité conformationnelle qui lui permet d'établir des interactions spécifiques avec les *N-formyl-peptide receptors* (FPRs). Ces récepteurs, de 7 segments transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques, incluent le FPR, FPRL1 et 2 (*FPR-like* 1, 2). Le FPR doit son nom au fait qu'il lie le fMLP avec une haute affinité et active fermement la réponse chimiotactique (Salvatisi *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Lee et Bae, 2008).

Après fixation du fMLP, les FPRs subissent des changements de conformation qui leur permettent d'interagir avec les protéines G_i . Ces protéines hétérotrimériques, constituées des sous unités α GTPase, β et γ , interviennent dans la plupart des effets stimulateurs des chimioattractants (Jin *et al.*, 2008; Lee et Bae, 2008). L'activation des FPRs conduit à l'échange du GDP liée au sous unité G_α contre le GTP et à la dissociation de la sous unité G_α -GTP du dimère $G_{\beta\gamma}$ (Salvatisi *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008).

Les deux sous unités G_α et $G_{\beta\gamma}$ activés permettent la transduction du signal à l'intérieur de la cellule où elles activent, à son tour, un ensemble des protéines effectrices telles que les phospholipases, la PKC, la PI3K et la voie de tyrosine Kinases à l'intermédiaires des seconds messagers tels que l'inositol triphosphate (IP3), le diacyl glycérol (DAG), et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire (Hwang *et al.*, 2006; Salvatisi *et al.*, 2006; Bernstein and Bamburg, 2010). Ces protéines effectrices modulent de multiples voies de signalisation intracellulaires qui régulent à la fin le processus de chimiotactisme du PMN, en intervenant dans les étapes de l'adhérence cellulaire, la réorganisation cytosquelettique, la formation de l'extension lamellipode, la contraction du corps cellulaire et le déplacement de l'uropode vers l'avant (Liu *et al.*, 2004; Zen *et al.*, 2006).

La PI3K γ activée par la sous unité $G_{\beta\gamma}$, sous la stimulation du le fMLP (Burelout *et al.*, 2007), joue un rôle central dans l'amplification asymétrique de la signalisation interne et ainsi dans la polarisation du neutrophile. En effet, l'accumulation sélective de ses produits, en particulier le phosphatidyl-inositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) dans la membrane du bord antérieur du neutrophile, permet de définir et de diriger ce bord principal vers le sens du gradient de chimioattractant par l'activation des membres de la famille des Rho GTPases tels que Rho, Rac et Cdc42 (Xu *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2010).

Une fois activée, la protéine Cdc42 empêche la formation des filopodes latéraux et régule la polarisation cellulaire dans le sens du gradient de chimioattractant. De plus, cette protéine peut activer la nucléation du complexe Arp2/3, le régulateur de la transformation de l'actine-G en actine-F (Mañes *et al.*, 2005; Firat-Karalar et Welch, 2011). Les protéines Rac, activées par le PIP3, sont également impliquées dans la polymérisation d'actine, la formation de lamellipode et à la mobilisation de la cellule vers l'avant (Millius *et al.*, 2009). Par ailleurs, la protéine RhoA activée phosphoryle la MLC kinase calcium/calmoduline-dépendante qui induit, à son tour, la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine II, située dans le bord postérieur du neutrophile. En effet, la RhoA régule l'association d'actine-myosine et intervient dans la rétraction de l'uropode du neutrophile (Saito *et al.*, 2002).

2.2. Phagocytose

Arrivés au site infecté, les PMNs recrutés ont pour but de reconnaître les agents envahisseurs, les ingérer par phagocytose et les détruire. La fonction phagocytaire du neutrophile dépend des opsonines extracellulaires en particulier les immunoglobulines de classe G (IgG1 et IgG3) et les dérivés du C3 du complément activé (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999) et les récepteurs qui reconnaissent ces opsonines tels que le FcγRs, le CR1(CD35) et le CR3 (CD11b/CD18), en facilitant l'adhérence entre le neutrophile et la cible (Lee *et al.*, 2003; Nuutila *et al.*, 2009). Cependant, des interactions directes peuvent être appliquées entre les PMNs et les cibles indépendamment des molécules opsonines mais *via* des récepteurs qui reconnaissent des motifs conservés à la surface des micro-organismes, parmi lesquels les récepteurs *Toll-like* (TLRs), les récepteurs des β-glycanes, Dectin-1 (Underhill et Gantner, 2004; Goodridge et Underhill, 2007).

Comme dans la figure 6, l'étape de l'adhésion est le plus souvent suivie d'une phagocytose de la particule opsonisée où les récepteurs se regroupent en clusters et déclenchent une série de signalisation intracellulaire. En fin, l'actine se polymérise et forme des pseudopodes d'internalisation qui entourent la particule cible, lorsque sa taille le permet, et l'englobent dans une vacuole de phagocytose ou phagosome (Allen et Aderem, 1996; Milon, 2005).

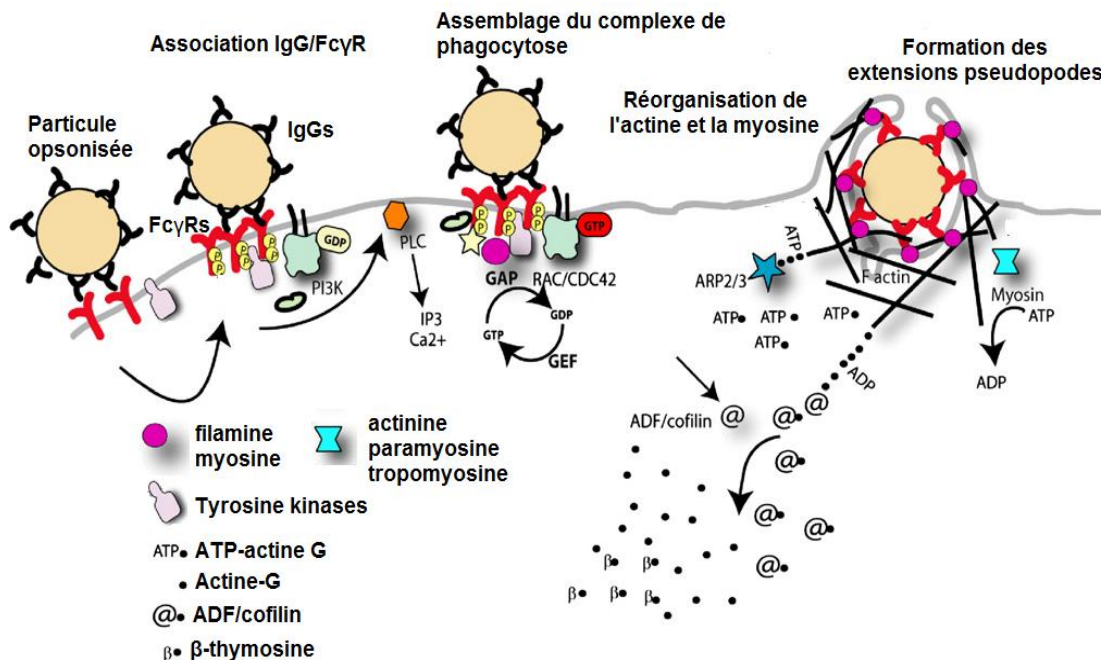


Figure 6. Mécanisme et voie de signalisation de phagocytose au sein du neutrophile. La particule étrangère opsonisée par IgG forme le complexe qui va être reconnu par les récepteurs de l'IgG (FcγRs) exprimés sur la surface du neutrophile. À la suite de cette reconnaissance, les récepteurs se regroupent en clusters et le signal se propage vers le réseau de l'actine-G cytosquelettique *via* une cascade de signalisation intracellulaire. L'actine-G se polymérise et forme des pseudopodes qui se développent jusqu'à ce que la particule soit entièrement englobée dans le phagosome (Florentinus *et al.*, 2011).

2.3. Dégranulation

La dégranulation est l'une des principales fonctions de neutrophiles, par laquelle les contenus granulaires sont libérés après la fusion des différents granules et vésicules sécrétoires avec la membrane du phagosome. Ce processus débute le plus souvent avant la fermeture complète du phagosome et le contenu des granules est déversé dans le phagolysosome, comme dans le milieu extracellulaire (Gougerot-Pocidallo et Halbwegs-Mecarelli, 2005; Nuutila *et al.*, 2009). La mobilisation hiérarchique et l'exocytose de dévers granules du PMN, suite à la stimulation par le fMLP, sont liées à un certain seuil du Ca^{2+} intracellulaire qui doit être dépassé (Faurichou et Borregaard, 2003). En effet, ces ions à un taux suffisant interviennent dans la réorganisation d'actine (Ligeti et Mócsai, 1999; Lacy, 2005) et régulent les interactions entre les récepteurs v- et t-SNAREs (*vesicle- et target-membrane-specific SNARE proteins*) exprimés sous forme de complexes à la surface des granules et de la membrane cible, respectivement (Ligeti et Mócsai, 1999; Lindmark *et al.*, 2002).

Sur la membrane plasmique du PMN, les t-SNAREs fournissent le lien de la fixation des v-SNAREs. En outre, les SNAPs, principalement le *N-ethylmaleimide sensitive factor* (NSF) et les SNAPs- α , - β , - γ (*NSF-attaching proteins*), interviennent fortement dans la régulation de la dégranulation (Borregaard *et al.*, 2007). Les associations SNAPs/SNAREs sont la machinerie qui régule la fusion et l'exocytose de granules (Fig. 7).

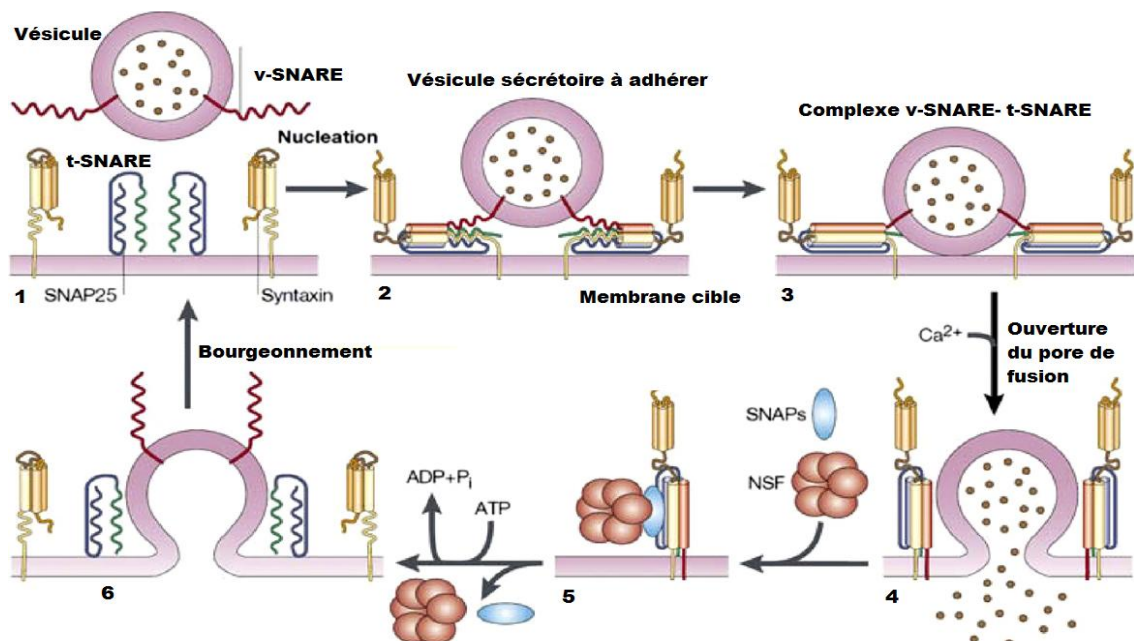


Figure 7. Modèle SNAREs expliquant la libération des granules du neutrophile. (1) v-SNARE exprimé à la surface de granules reconnaît spécifiquement le t-SNARE présents sur la membrane plasmique. (2) L'assemblage des SNAREs permet (3) l'ancrage de la vésicule à la membrane cible puis (4) la fusion des deux membranes et la libération du contenu granulaire. (5) La liaison des SNAPs facilite la fixation de NSF (ATPase). (6) L'hydrolyse de l'ATP par NSF permet la dissociation des SNAREs (Adapté de Hussain et Davanger, 2011).

2.4. Libération des médiateurs pro-inflammatoires

Étant souvent la première cellule inflammatoire recrutée au site d'agression, le neutrophile peut moduler la réponse inflammatoire, communiquer avec les cellules environnantes et amener à la migration des autres cellules inflammatoires *via* la production des plusieurs médiateurs lipidiques et peptidiques.

Les principaux médiateurs lipidiques générés dans les neutrophiles sont le PAF, la leucotriène (LTB₄), la prostaglandine (PGE₂) et le thromboxane TXA₂ (Hsu *et al.*, 2004; Lötzer *et al.*, 2007). Au sein du neutrophile activé, le TXA₂ avec la PGE₂ et les peptido-leucotriènes (LTC₄, LTD₄ et LTE₄) sont produits par les cyclooxygénases (Cox-1/-2) et 5-lipoxygénase respectivement et présentent des propriétés vasoconstrictrices et vasodilatatrices (Haeggström *et al.*, 2010). Les PMNs sont également une source importante d'autres dérivés lipidiques tels que les lipoxines LX (A₄ et B₄), médiateurs anti-inflammatoires qui favorisent la résolution des tissus enflammés pour être rendus à l'homéostasie (Baetta et Corsini, 2010).

Arrivés au site infecté, les neutrophiles activés libèrent une variété des médiateurs protéiques comme l'IL-8, le GM-CSF, le G-CSF, le TNF- α , l'interféron- γ et la *macrophage inflammatory proteine-1*, MIP-1 α et MIP-1 β (Schröder *et al.*, 2005; Kumar et Sharma, 2010). Pendant la phagocytose, les neutrophiles régulent positivement l'expression d'une variété de (CC- et CXC-) chimiokines et de cytokines qui agissent en tant que médiateurs d'autocrine/paracrine stimulant le changement de la forme du neutrophile, le chimiotactisme des cellules immunisées et la production des ROS (Padrines *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2007; Maio *et al.*, 2011; Witko-Sarsat *et al.*, 2011).

2.5. Flambée respiratoire

Pendant la réaction inflammatoire, les PMNs synthétisent de ROS afin de détruire le pathogène phagocyté. La production des ROS est initiée par l'activation du complexe NADPH oxydase qui génère l'anion superoxyde O₂⁻, dans le processus de l'explosion oxydative (Massenet *et al.*, 2005). Ce phénomène est associé à l'augmentation de la consommation de l'oxygène moléculaire et à l'activation de la voie des hexoses monophosphates, source endogène du NADPH (Borjesson *et al.*, 2005).

Au repos, les constituants du système NADPH oxydase sont distribués dans des compartiments subcellulaires distincts, ce qui garantit son inactivité. Les composants p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et la Rac GTPase forment un complexe dans le cytosol de la cellule, tandis que les deux autres composants (flavine-hémeglycoprotéine gp91^{phox} et p22^{phox}) se localisent

dans les membranes des vésicules sécrétoires et des granules spécifiques (Werner, 2004; Massenet *et al.*, 2005; Ueyama *et al.*, 2007). Sous la stimulation du neutrophile, le système NADPH oxydase devient actif après l'assemblage de ces composés cytosoliques avec ceux membranaires (Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Dang *et al.*, 2011). La dismutation de $O_2^{\cdot-}$ donne naissance au superoxyde d'hydrogène qui favorise la production d'une variété des substances hautement réactives (Fig. 8) telles que le $\cdot OH$ et le HOCl (Murphy et DeCoursey, 2006). Toutefois, la surproduction des ROS peut endommager les cellules et les composants tissulaires ce qui peut entraîner des maladies inflammatoires graves.

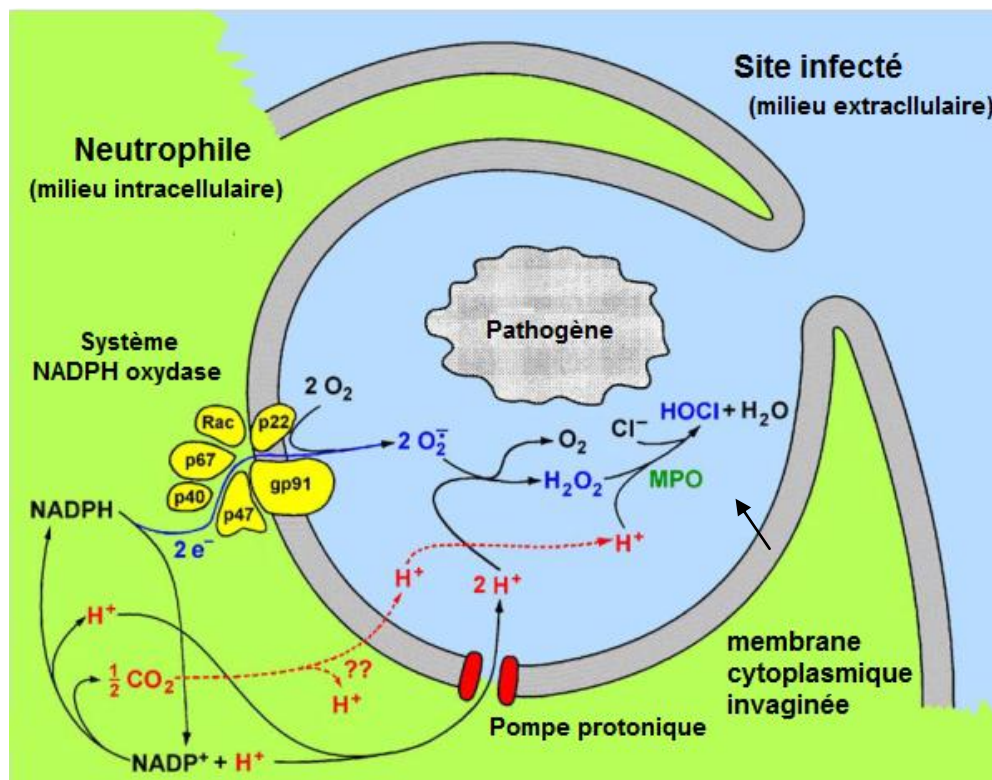


Figure 8. Système NADPH oxydase et génération des ROS par les neutrophiles stimulés. Durant la phagocytose, le pathogène est détruit par des substances cytotoxiques libérées après la fusion des différents granules et vésicules avec le phagosome. Les constituants du complexe NADPH oxydase sont assemblés en réponse aux produits pathologiques libérés dans le site infecté, principalement le fMLP. Le système NADPH oxydase actif transfère un électron du NADPH à travers la membrane cellulaire pour réduire l' O_2 moléculaire en anion $O_2^{\cdot-}$. L'anion $O_2^{\cdot-}$ est l'origine des autres espèces fortement microbicides qui peuvent être produites sous l'action des autres enzymes comme la myéloperoxydase, MPO (Murphy et DeCoursey, 2006).

3. Elastase leucocytaire

Les élastases de la famille de chymotrypsine-like incluent l'élastase leucocytaire, l'élastase pancréatique, la métallo-élastase de macrophage et l'élastase de fibroblaste. L'élastase du neutrophile humain (HNE; E.C. 3.4.21.37) est une serine protéase de 29 à 33kDa avec plusieurs isoformes qui diffèrent de glycosylation. HNE est synthétisée sous forme d'une glycoprotéine zymogène et prend son activité après une série de clivages protéolytiques (Kawabata *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2011). Sous sa forme active, la HNE est principalement située dans les granules azurophiles de PMNs avec d'autres serine protéases (Nozawa *et al.*, 2000; Kawabata *et al.*, 2002). Une fois les neutrophiles sont activés, une quantité élevée d'élastase est libérée dans des phagolysosomes afin de digérer les micro-organismes phagocytés. Par ailleurs, la HNE rapidement sécrétée dans l'espace extracellulaire dégrade une variété des protéines intercellulaires, membranaires et plasmatiques (Sun et Yang, 2004; Korkmaz *et al.*, 2008).

3.1. Structure de l'élastase leucocytaire

Le gène de HNE (*HNE2* de 4Kb) est organisé en 5 exons alternatifs avec 4 introns et localisé sur le bras court du chromosome 19, dans un cluster avec les gènes codants la protéinase-3 et l'azurocidine (Sun et Yang, 2004; Belaouaj, 2002). Ce gène code une pré-proprotéine de 267 acides aminés qui subit des modifications post-traductionnelles aux deux extrémités (Fig. 9). Le clivage de l'extrémité pro-N-terminale est essentiel pour l'acquisition de son activité catalytique et facilite également son stockage optimal dans les granules azurophiles (Garwicz *et al.*, 2005). En outre, l'extrémité pro-C-terminale est également éliminée pour atteindre la conformation requise de l'enzyme à destiner hors des vésicules *trans*-Golgi aux granules azurophiles (Horwitz *et al.*, 2004; Pham, 2008; Källquist *et al.*, 2010).

L'activité de la HNE est associée à une triade catalytique constituée de His-57, Asp-102 et Ser-195. Dans la structure primaire de l'élastase, ces trois résidus sont largement séparés et ils vont être rassemblés pour former son site actif en sa structure tertiaire (Fig. 10). En fin, la mobilisation des granules azurophiles des PMNs et la dégranulation de leurs contenus, constitués principalement d'élastase, sont déclenchées au cours des interactions neutrophile-endothélium vasculaire (Gu *et al.*, 2011).

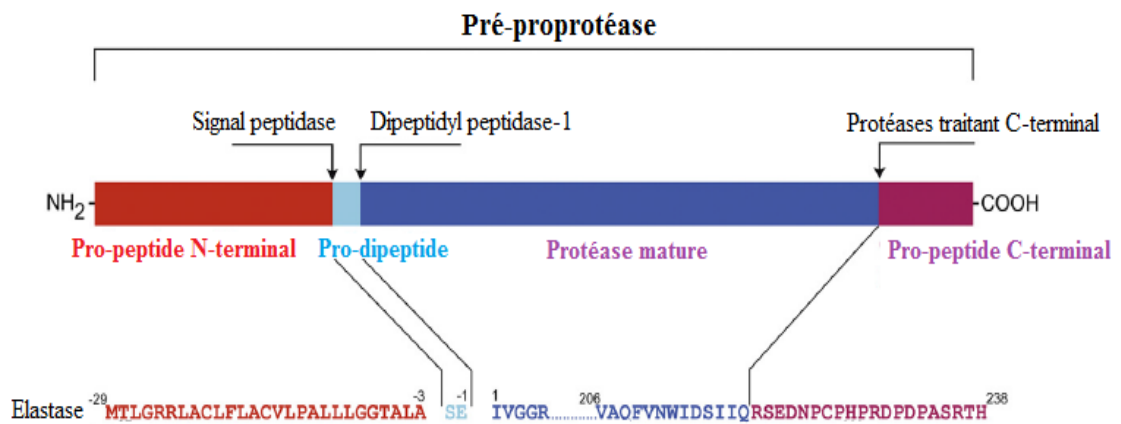


Figure 9. Diagramme structural de la forme pré-proprotéase de l'élastase leucocytaire. Le zymogène se compose d'un peptide typique du signal (N-terminale) suivi d'un pro-dipeptide et d'une prolongation C-terminale. La protéase mûre stockée dans les granules primaires des neutrophiles est subie des clivages protéolytiques multiples impliquant le signal peptidase, la dipeptidyl peptidase-I et l'enzyme traitant C-terminale aux positions indiquées dans la séquence (Wiesner *et al.*, 2005; Korkmaz *et al.*, 2008).

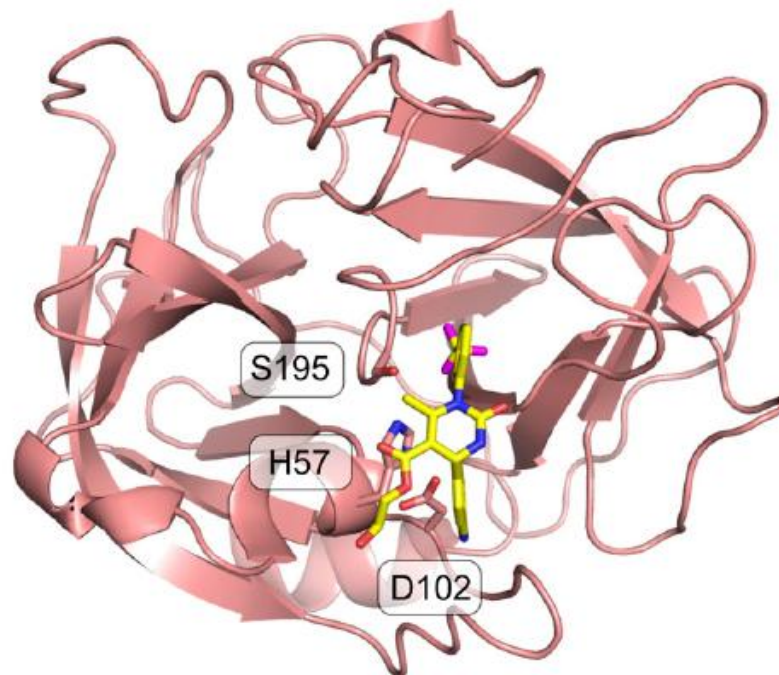


Figure 10. Structure tertiaire de l'élastase leucocytaire et son site actif. La triade (Ser-195, His-57 et Asp-102) du site actif est associée à l'inhibiteur dihydro-pyrimidone (DHPI) de HNE. La HNE est représentée avec une couleur brune et le DHPI en jaune (Hansen *et al.*, 2011).

3.2. Substrats spécifiques de l'élastase leucocytaire

Dans les conditions physiologiques, la HNE dégrade tous corps protéiques étrangers phagocytés par les neutrophiles. En effet, cette protéase a une large gamme de substrats. la HNE sert non seulement au clivage de l'élastine fibreuse insoluble mais presque à tous les constituants protéiques de la matrice extracellulaire, des tissus connectifs et des membranes basales (Kawabata *et al.*, 2002 ; Gu *et al.*, 2011) telles que le collagène, la fibronectine, la laminine et les protéoglycanes (Fujie *et al.*, 1999; Nozawa *et al.*, 2000; Góngora *et al.*, 2002). De plus, elle peut hydrolyser des protéines plasmatiques (Gu *et al.*, 2011), les récepteurs des plaquettes IIb/IIIa, et ceux du complément et des cadherines (Alam *et al.*, 2011). En outre, la HNE peut agir sur quelques facteurs de croissance (Sun et Yang, 2004) et dégrader des divers cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et TNF α (Owen *et al.*, 1995), l'IL-2 (Ariel *et al.*, 1998) et IL-6 (Bank *et al.*, 1999).

Parmi les enzymes protéolytiques du neutrophile, la HNE est la plus connue pour sa capacité de dégrader ses substrats par le transfert des électrons au niveau du site actif à partir du groupe carboxylique de l'acide aminé Asp-102 à l'oxygène de Ser-195 qui devient un nucléophile et attaque la liaison peptidique spécifique (Belaouaj, 2002; Heinz *et al.*, 2012). Préférentiellement, Cette protéase hydrolyse la liaison peptidique adjacente d' un acide aminé hydrophobique et/ou aliphatique tel que l'alanine, la valine, la glucine ou l'isoleucine (Hansen *et al.*, 2011; Heinz *et al.*, 2012).

Des nombreuses investigations ont prouvé que la HNE est non seulement une protéase mais c'est un important régulateur qui contrôle la réponse immunitaire innée et module la signalisation cellulaire et le fonctionnement des cellules inflammatoires. En effet, L'élastase peut agir sur la sécrétion des cytokines et des interleukines et activer leurs récepteurs spécifiques exprimés sur les surfaces de cellules cibles (Benedek *et al.*, 2007; Pham, 2008; Alam *et al.*, 2011; Heinz *et al.*, 2012). En outre, la HNE joue un rôle important dans l'agrégation et l'adhérence plaquettaire (Wohner *et al.*, 2011), l'activation des lymphocytes et l'infiltration des sites enflammés par les neutrophiles (Raptis *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2011). De plus, la HNE peut stimuler la production de l'IL-6, l'IL -8 et le GM-CSF (Seidle *et al.*, 2003; Alam *et al.*, 2011).

3.3. Inhibiteurs endogènes de l'élastase leucocytaire

Une fois libérées, l'élastase leucocytaire demeure active dans l'environnement extracellulaire. Dans les conditions physiologiques normales, son activité protéolytique est étroitement réglée par les serpinines, inhibiteurs endogènes des sérine-protéinases incluant le α_1 *proteinase inhibitor* (α_1 -PI ou α_1 -antitrypsine), l'elafin ou *skin-derived anti-leukoprotease* (SKALP), le *secretory leukocyte peptidase inhibitor* (SLPI) et la α_2 -macroglobuline. Ces inhibiteurs des protéases sont libérés localement dans le site endommagé (Fujie *et al.*, 1999; Henriksen *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2011).

L' α_1 -antitrypsine de la famille des serpinines est le principal inhibiteur endogène de la HNE. Les serpinines représentent approximativement 10% de toutes les protéines du plasma, dont le α_1 -antitrypsine constitue 70% de ceux-ci (Zsila *et al.*, 2010). Cet inhibiteur est principalement sécrété par les cellules hépatiques, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales. La concentration plasmatique de α_1 -PI augmente jusqu'à 3 ou 4 fois durant l'inflammation (Henriksen *et al.*, 2008; Dokai *et al.*, 2011).

Dans le foyer inflammatoire, l'élastase de neutrophiles peut échapper à la régulation des anti-protéases par différents mécanismes. D'abord, les inhibiteurs endogènes, ayant des grands poids moléculaires, ne peuvent pas accéder au microenvironnement entre l'élastase et ses substrats tissulaires, à cause des limitations stéréochimiques. De plus, l'activité protéolytique de la HNE liée au substrat n'est pas complètement inhibée par ces inhibiteurs pourtant ils peuvent totalement bloquer l'activité de l'élastase plasmatique libre (Owen *et al.*, 1995). Un autre mécanisme est que l'inhibiteur spécifique de la HNE (α_1 -antitrypsine) est inactivé par l'oxydation de son site catalytique en présence des ROS produites par les PMNs activés (Fujie *et al.*, 1999). Ces mécanismes, en ensemble, peuvent mener à un déséquilibre local entre la HNE et les inhibiteurs endogènes et favorisent l'attaque des tissus.

3.4. Inhibiteurs synthétiques de l'élastase leucocytaire

Lorsque l'activité inhibitrice des inhibiteurs endogènes de protéases est altérée, l'intervention des inhibiteurs synthétiques de l'élastase devient nécessaire pour empêcher les dommages tissulaires sans interférences mécanistiques de la taille et de la limitation stérique des inhibiteurs endogènes (Dokai *et al.*, 2011).

En raison de sa nature fortement cationique, l'élastase leucocytaire se lie aux poly-anions comme le glycosaminoglycane sulfaté (Bartolucci *et al.*, 1995; Seidle *et al.*, 2003) et les dérivés de l'alkyl-tri-méthyle-ammonium-bromures qui inhibent efficacement son activité

(Kouadri-Boudjelthia et Wallach, 1997). Des composés non protéiques incluant FR134043 (Fujie *et al.*, 1999), le SSR69071 (Bidouard *et al.*, 2003), le 2-pyridin-3-yl-benzo[d][1,3]oxazin-4-one (Shreder *et al.*, 2009), l'acide oléique et l'oleoyl-galardin (Moroy *et al.*, 2011) inhibent également l'activité protéolytique de la HNE. Récemment, Hansen *et al.* (2011) ont montré que le dihydro-pyrimidone se lie au site actif de la HNE, d'une manière non-covalente, et inhibe fortement son activité catalytique. En outre, les esters aromatiques de l' α -aminoalkyl phosphonates et les anti-élastases protéiques synthétiques sont également des inhibiteurs efficaces et irréversibles (Sieńczyk *et al.*, 2011, Hansen *et al.*, 2011). Toute fois, la plupart des inhibiteurs synthétiques ont montré une toxicité et des effets secondaires pendant des épreuves cliniques (Gu *et al.*, 2011).

3.5. Effets délétères de l'élastase leucocytaire

Lorsque le site enflammé est infiltré par un grand nombre de neutrophiles et lorsque des quantités énormes de l'élastase activée sont libérées, l'activité élastasique devient excessive ce qui induit des dommages intenses du tissu. De ce fait, la HNE intervient dans la pathogénie des plusieurs maladies inflammatoires aiguës et chroniques comme la fibrose kystique (Voynow *et al.*, 2008) et l'arthrite rhumatoïde (Korkmaz *et al.*, 2008). Cette enzyme cytotoxique se trouve également aux plaques d'athérosclérose (Henriksen *et al.*, 2008). Au niveau de poumons, la HNE excessivement libérée peut échapper à la régulation des différents anti-protéases et cause l'emphysème et les lésions pulmonaires (Kawabata *et al.*, 2002), la bronchite chronique, le syndrome de détresse respiratoire aiguë et la maladie pulmonaire obstructive chronique, COPD (Sun et Yang, 2004; Hansen *et al.*, 2011).

L'arrêt de la maturation myélopoïétique de neutrophiles est associée à la neutropénie héréditaire, cyclique et congénitale grave (Aprikyan *et al.*, 2001; Sun et Yang, 2004; Horwitz *et al.*, 2007). La base moléculaire de ces maladies est que les mutations dans le gène *ELA2* codant la HNE perturbent l'adressage physiologique de cette protéase et conduisent à son accumulation intracellulaire qui déclenche la réponse apoptotique dans les myélocytes (Pham, 2008).

D'ailleurs, Taniguchi *et al.* (2002) ont trouvé des polymorphismes de nucléotides au niveau du promoteur de *ELA2* chez 348 patients qui présentent le cancer du poumon. Les cellules tumorales produisent excessivement diverses protéases et principalement la HNE qui hydrolyse rapidement les constituants tissulaires. L'activité élastasique intervient non seulement durant l'invasion des cellules cancéreuses (la métastase) mais également dans leur adhérence aux cellules endothéliales vasculaires (Nozawa *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2006).

4. *Pistacia lentiscus* L.

4.1. Distribution géographique

Le genre *Pistacia* appartient à la famille de l'Anacardiaceae. Dans le monde, il y a 10 espèces de ce genre dont les plus connues sont *Pistacia lentiscus* L., *P. terebinthus* L., *P. vera* L., *P. atlantica*, *P. integerrima*, *P. palestina*, *P. khinjuk* et *P. chinensis* (Adams *et al.*, 2009). En Algérie, les quatre premières espèces sont les plus répandues (Ghalem et Benhassaini, 2007). *P. lentiscus* est une plante aromatique que l'on trouve couramment en sites arides intensifs de l'Asie et de la région méditerranéenne de l'Europe et de l'Afrique, jusqu'aux Canaries. Cette espèce thermophile pousse à l'état sauvage dans la garrigue. Elle est retrouvée sur tout type de sol aride et subhumide en l'Algérie (Dedoussis *et al.*, 2004; Palacio *et al.*, 2005).

4.2. Nomenclature et classification botanique

Pistacia lentiscus a été connu par de nombreux synonymes parmi les quels *Lentiscus massiliensis* (Mill.), *Terebinthus vulgaris* Fourr., *Pistacia narbonensis* Mill., *Pistacia chia* Desf....etc. et actuellement *Pistacia lentiscus* L. a également des noms vernaculaires tels que le lentisque (Français), chios mastic tree (Anglais) et darou en arabe. *Pistacia lentiscus* est botaniquement classifié comme un arbrisseau de

Règne: Plantae

Embranchement: Tracheobionta

Super-division: Spermatophyta

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sous-classe: Residae

Ordre: Sapindales

Famille: Anacardiaceae

Genre: *Pistacia*

Espèce: *lentiscus*

4. 3. Description botanique

P. lentiscus est un arbrisseau (Fig. 11A) ramifié de 3 à 7m d'hauteur, dans les conditions favorables, avec une odeur forte et désagréable de résine. Les branches de cette plante sont tortueuses et pressées. Les feuilles sont persistantes et paripennées de 6 à 10 paires de folioles elliptiques. De plus, elles sont dures, glabres, coriaces, luisantes en dessus et pâles en dessous avec un pétiole étroitement ailé (García-Fayos et Verdú, 1998). Cet arbuste est dioïque (fleurs

mâles et femelles poussant sur des arbustes différents). La floraison (Fig. 11B) apparait entre mars et la fin d'avril. Selon le sexe, la couleur des fleurs est variée de rouge foncé (les fleurs mâles) au rouge clair pour les fleurs femelles qui sont regroupées en racèmes de 8 à 10 fleurs (Jordano, 1989 ; Castro-Díez *et al.*, 1998).

Après pollinisation, les arbustes femelles produisent des fruits en drupes (Fig. 11C) en fin d'été. Les fruits sont initialement des baies rouges globuleuses. Ces baies ont besoin au moins 50 jours, en automne, pour atteindre leur maturité. Les baies noires mures contiennent des graines viables tandis que les baies rouges renferment des graines non viables (Jordano, 1989; Montserrat-Martí et Pérez-Rontomé, 2002).



Figure 11. Photographies de *Pistacia lentiscus*. (A) Aspect général de la plante (B) Les fleurs (C) Les feuilles et les baies (D) La résine.

4. 4. Composition chimique de *P. lentiscus*

Les branches et le tronc du *P. lentiscus* exsudent naturellement ou par incision une résine appelée mastic (Fig. 11D). Le mastic est un suc jaune clair, fortement aromatique qui au contact de l'air devient d'ur et forme une gomme dite mastic. Une fois distillé, le mastic fournit une essence qui a fait l'objet de nombreuses études (Duru *et al.*, 2003; Dedoussis *et al.*, 2004; Paraschos *et al.*, 2011). Les huiles essentielles sont également extraites des feuilles et des rameaux de *P. lentiscus* (Duru *et al.*, 2003; Gardeli *et al.*, 2008 ; Djenane *et al.*, 2011). Selon Gardeli *et al.* (2008), les constituants des huiles essentielles des feuilles sont caractérisés par un taux élevé des monoterpènes (45-68%), suivis par des monoterpènes oxygénés (13-23%) et des sesquiterpènes (9-28%).

Neuf flavonoïdes glycosides ont été isolés de la fraction d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de 4 espèces de *Pistacia* (tableau 1), parmi lesquelles *P. lentiscus* (Kawashty *et al.*, 2000; Vaya et Mahmood, 2006). En outre, la richesse des feuilles de *P. lentiscus* en polyphénols a été rapportée (Romani *et al.*, 2002; Baratto *et al.*, 2003) où les trois grandes classes de métabolites secondaires identifiés sont des gallotannins à faible poids moléculaire tels que les dérivés 5-O, 3.5-O-di- et 3.4.5-O- trigalloyl de l'acides quinique, les anthocyanes en particulier la delphinidine 3-O-glucoside et la cyanidine 3-O-glucoside et les flavonols glycosides comme les glucosides de la quercétine et de la myricétine.

Tableau 1. Flavonoïdes dans 4 espèces de *Pistacia* (Kawashty *et al.*, 2000).

Composant	<i>Pistacia atlantica</i>	<i>Pistacia chinensis</i>	<i>Pistacia khinjuk</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>
Kaempferol-3-glucoside	+	++	-	+
quercétine-3-glucoside	+++	+++	++	+++
quercétine-3-galactoside	++			
quercétine-3-rutinoside	+	-	++	+
quercétine-3-glucoside-7-galactoside	+	-	-	-
myricétine-3-glucoside	-	-	+++	+
myricétine-3-galactoside	-	-	+++	-
myricétine-3-rutinoside	-	-	+++	-
Vicenin-2	++	+	-	+

L'étude phytochimique effectuée sur les fruits de *P. lentiscus* par HPLC–DAD–SM a permis d'identifier 3 anthocyanes (Fig. 12) à savoir la cyanidine 3-O-glucoside, la delphinidine 3-O-glucoside et la cyanidine 3-O-arabinoside (Longo *et al.*, 2007). Une autre étude chimique réalisée sur la fraction d'acétate d'éthyle de ces fruits a permis d'isoler deux polyphénols, l'acide gallique et le 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose (Abdelwahed *et al.*, 2007). Ainsi, ces fruits comestibles sont considérés comme une source naturelle d'une huile fixe, l'huile du lentisque.

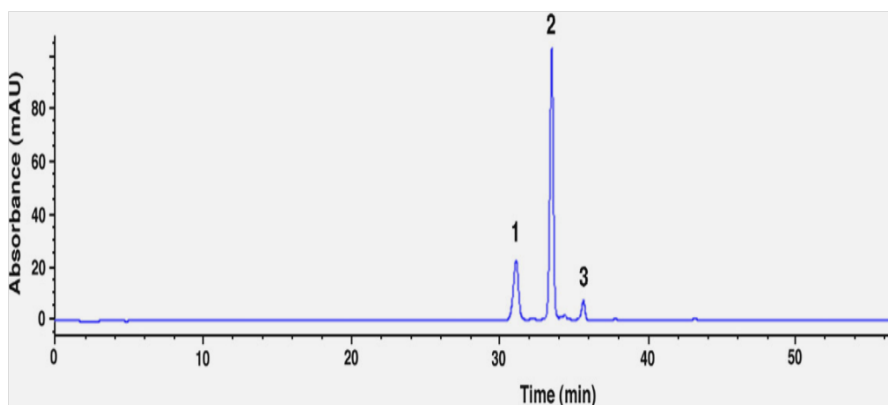


Figure 12. Chromatogramme correspondant à l'extrait épuré des fruits de *P. lentiscus*. (1) Delphinidine 3-O-glucoside. (2) Cyanidine 3-O-glucoside. (3) Cyanidine 3-O-arabinoside (Longo *et al.*, 2007).

4. 5. Usage traditionnel et activités biologiques de *P. lentiscus*

Pendant des siècles, les peuples ont développé des bonnes connaissances sur les plantes médicinales suite à leur fréquent contact avec l'environnement naturel. Parmi ces plantes, *P. lentiscus* a été utilisée incorporé dans les cuisines méditerranéennes (grecques, turques et arabes) et en médecine traditionnelle.

La partie aérienne de *P. lentiscus* a été traditionnellement utilisée, pour ses propriétés diurétiques et pour traiter les toux, les gorges enflammées, l'hypertension, les lithiases du rein et l'ictère. Cependant, les feuilles sont utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement de l'eczéma, la diarrhée et les infections buccales. En Tunisie, la décoction des feuilles ou de l'écorce de la racine est effectuée contre les ulcères gastriques et les maux de l'estomac (Benhammou *et al.*, 2008; Gardeli *et al.*, 2008).

La médecine traditionnelle algérienne utilise surtout l'huile du lentisque dans le traitement des petites plaies, des brûlures légères et de l'érythème. De plus, l'huile est administrée par voie orale pour traiter les problèmes respiratoires d'origine allergique, les désordres gastriques, la constipation et les ulcères de l'estomac (Reig-Armiñana *et al.*, 2004).

Certaines investigations ont montré que l'extrait brut de *P. lentiscus*, ses huiles essentielles et quelques constituants de triterpénoides ont des activités antioxydantes et anti-inflammatoires (Duru *et al.*, 2003; Benhammou *et al.*, 2007), antifongiques et antimicrobiennes (Magiatis *et al.*, 1999; Benhammou *et al.*, 2008). Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques, des feuilles et des fruits, et leurs capacités de piéger les radicaux libres ont été également rapportées (Baratto *et al.*, 2003; Abdelwahed *et al.*, 2007; Benhammou *et al.*, 2007). Janakat et Al-Merie (2002) ont signalés une efficacité de l'extrait aqueux (bouillis et non bouillis) des feuilles de *P. lentiscus* dans le traitement de l'ictère hépatique chez les rats et probablement chez l'homme.

La partie aérienne semble une faible activité antimicrobienne contre des bactéries gram négatives et gram positives par rapport à son activité antifongique qui est beaucoup plus intéressante contre la levure clinique (Iauk *et al.*, 1996) et les mycètes pathogènes (Kordali *et al.*, 2003). Magiatis et ses collaborateurs (1999) ont démontré que les huiles essentielles de la résine sont très actives contre les bactéries et les mycètes, tandis que celles des feuilles ont une activité modérée contre les bactéries et sont complètement inactives contre les mycètes. Les mêmes résultats ont été obtenus avec certains champignons (Duru *et al.*, 2003; Koutsoudaki *et al.*, 2005; Paraschos *et al.*, 2011). De plus, la résine de *P. lentiscus* joue un rôle thérapeutique contre des divers dysfonctionnements gastriques, tels que la gastralgie, la dyspepsie et l'ulcère gastrique à cause de son effet antibactérien *in vivo* contre les *Helicobacter pylori* (Al-Said *et al.*, 1986; Dabos *et al.*, 2010).

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1. 1. Matériel biologique

Les polymorphonucléaires (PMNs) neutrophiles ont été isolés à partir du sang humain frais. Ce sang est obtenu par prélèvement veineux au pli du coude de volontaires sains, non fumeurs et qui ont certifié n'avoir subi aucune médication au moins durant les derniers 15 jours qui ont précédé le prélèvement.

1. 2. Matériel végétal

Les feuilles et les fruits de *P. lentiscus* L. ont été récoltés en octobre 2010, de la région de Flifla-Skikda (Nord d'Est d'Algérie). L'identification a été déterminée par Pr. Laaouer H. (département de botanique, faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Ferhat Abbas- Sétif).

Après la récolte, les baies entièrement pigmentées (violette foncée) ont été congelées à 4°C, et avant leur utilisation elles ont été décongelées, rincées et séchées. Cependant, les feuilles ont été séchées à l'ombre dans un endroit sec et à température ambiante pendant quelques jours puis 9h à 50°C. Les feuilles séchées ont été emballées et stockées à température ambiante dans des sacs en papier.

1. 3. Solutions du travail

Tous les produits chimiques et les solvants utilisés dans cette étude sont de grade analytique et proviennent de Sigma (Germany), Fluka (Germany) et Prolabo (France). Les solutions du travail sont les suivantes

- Héparinate de lithium (50U/ml), préparé dans du NaCl 0.9% puis répartie en aliquote de 1 ml et gardée à -32°C.
- Dextran 10%, préparé dans du NaCl 0.9% puis répartie en aliquote (2 ml) et gardée à -32°C.
- Hanks Balanced Salt Solution avec ou sans Ca^{2+} et Mg^{2+} (HBSS₂ et HBSS₁) respectivement préparé à 0.95% dans l'eau distillée fraîche. Le pH du tampon est ajusté à 7.4 avec du NaOH 0.1N.
- Ovalbumine (0.25%), préparé dans le HBSS₂.
- Tampon phosphate PBS (50mM), préparé en mélangeant la solution acide de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50mM) avec la solution basique de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50mM) jusqu'à l'obtention d'un pH égale à 7.4. Le mélange obtenu est ensuite supplémenté par du NaCl (150mM).

- Tampon HEPES 0.1M, préparé dans du NaCl 0.5M. Le pH est ajusté à 7.4 avec du NaOH 0.1N.
- Solution Türk, préparée en mélangeant 1ml de violet de gentiane à 1ml d'acide acétique, puis le volume est complété à 100ml par de l'eau distillée.
- Bleu de Trypan (0.4%), préparé dans du NaCl 0.9% puis filtré.
- fMLP (10^{-2} M), préparé dans le DMSO. La solution est aliquotée (10 μ l) et gardée à -32°C.
- Cytochalasine B (2mM), préparé dans du DMSO. La solution est aliquotée (20 μ l) et gardée à -32°C.
- Substrat d'élastase : *N*-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-*p*-Nitroanilide (250mM), préparé dans 1-Methyl-2-Pyrrolidinone, la solution est conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

2. Méthodes

2. 1. Extraction

L'extraction aqueuse des feuilles de *P. lentiscus* a été réalisée selon la méthode de Ljubuncic *et al.* (2005). Brièvement, 25g des feuilles séchées et découpées en petites pièces sont placées dans 250ml d'eau distillée. Après une décoction de 20min, l'extrait est filtré puis centrifugé à 3000rpm pendant 10min. Le surnageant obtenu est lyophilisé et conservé à -32°C (Fig. 13).

L'extraction méthanolique des feuilles a été effectuée par macération selon le protocole de Beara *et al.* (2010). 25g des feuilles séchées et découpées sont mises dans 250ml du méthanol 80% sous agitation à l'obscurité pendant 24h. Après filtration et centrifugation, le solvant du surnageant est évaporé à 40°C, le résidu obtenu est séché puis conservé à -32°C.

La macération des baies de *P. lentiscus* a été réalisée selon le protocole de Longo *et al.* (2007). une prise de 25g des baies concassées a été trempée dans 50ml de méthanol acidifié (HCl 0.1%) pendant 24h à l'obscurité. L'extrait est filtré et centrifugé avant l'évaporation du solvant à 40°C. Ensuite, le filtrat est séché et gardé à -32°C.

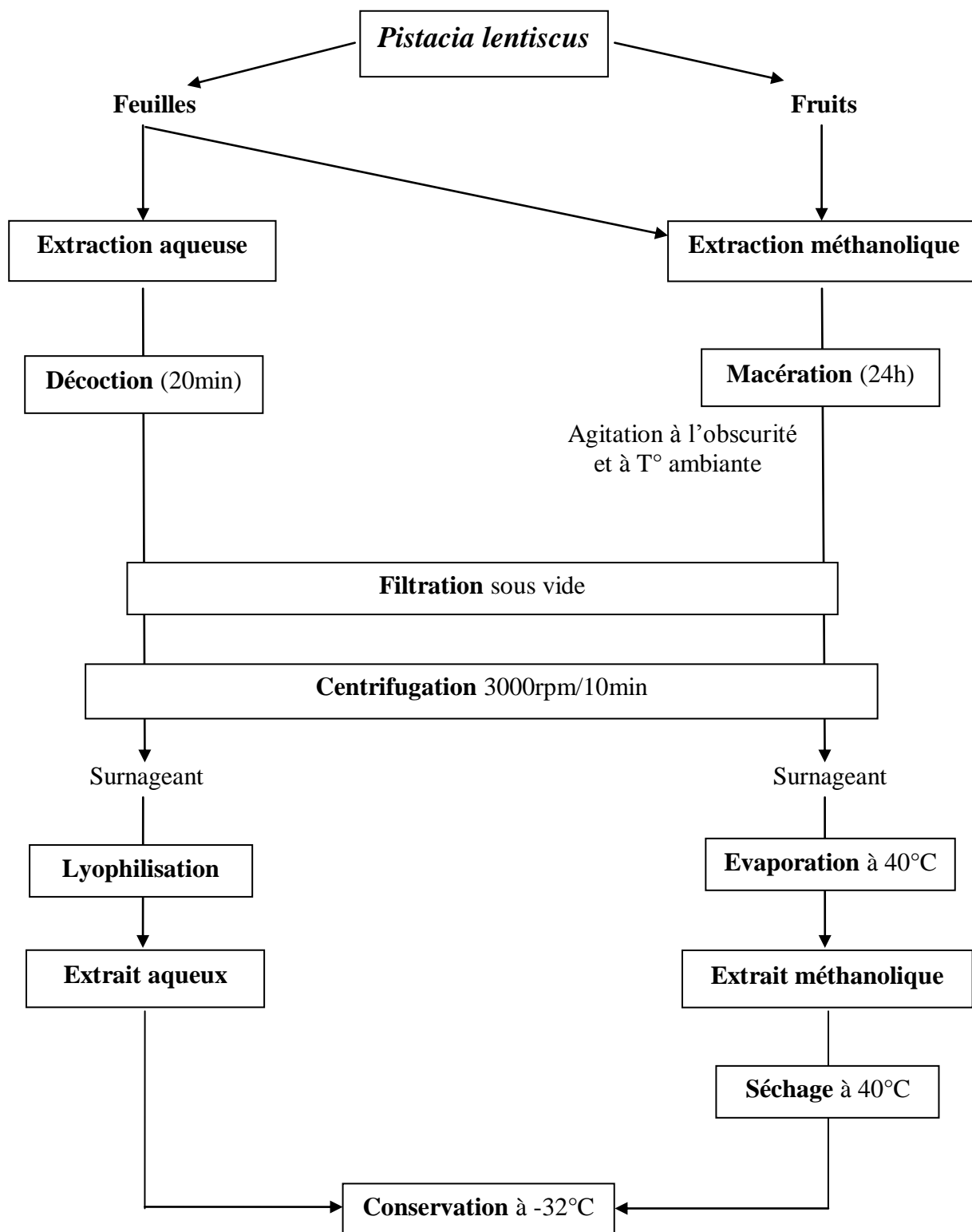


Figure 13. Protocoles d'extraction au milieu aqueux et méthanolique des feuilles et des fruits de *P. lentiscus*.

2. 2. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes de *P. lentiscus*

2. 2. 1. Dosage des composés phénoliques

La teneur totale en composés phénoliques solubles dans les trois extraits de *P. lentiscus* a été estimée avec le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Slinkard et Singleton (1977), en utilisant l'acide gallique comme standard. Brièvement, 100µl de différentes concentrations de chaque extrait ou du standard ont été mélangés à 500µl du réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1/10). Après une incubation de 4min à température ambiante, 400µl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 7.5% sont ajoutés. L'absorbance est mesurée après 2h d'incubation à 765nm (spectrophotomètre Thermo Spectronic, USA), contre un blanc contenant le solvant au lieu de la substance testée. La concentration en polyphénols dans chaque extrait est exprimée en µg d'équivalents d'acide gallique par mg d'extrait (EAG µg/mg d'extrait), et calculée à partir de l'équation de régression établie de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (20-160µg/ml).

2. 2. 2. Dosage des flavonoïdes

Pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *P. lentiscus*, la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) a été utilisée. Le mélange de 1ml d'échantillon ou du standard (préparés dans du méthanol) à 1ml de la solution d' AlCl_3 (2%) est incubé pendant 10min puis l'absorbance est lue à 430nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine de 2 à 16µg/ml, et elle est exprimée en µg d'équivalents de quercétine par mg d'extrait (EQ µg/mg d'extrait).

2. 3. Préparation des cellules

2. 3. 1. Isolement des neutrophiles

Les neutrophiles PMNs sont isolés selon la méthode décrite par Selloum et ses collaborateurs (2001). Dans un tube conique en polypropylène, 10ml de sang sont prélevés sur 1ml d'héparinate de lithium (5U/ml) puis 2ml de dextran 10% sont additionnés pour accélérer la vitesse de sédimentation des hématies. Après une heure de sédimentation à température ambiante, le plasma est récupéré dans un nouveau tube au fond duquel l'histopaque[®]-1077 est injecté. Ensuite, le tube conique est centrifugé à 1000rpm/ 25min/ 4°C (Rotina R 35, Germany). Avec une densité supérieure à 1.077, les neutrophiles sont précipités au fond du tube, en formant un culot avec des hématies. Ces hématies résiduelles sont éliminées *via* une série d'hémolyse par 1ml d'eau distillée froide. À chaque fois, l'hémolyse est arrêtée après 30s en ajoutant 5ml de HBSS₁ frais. La suspension est en suite centrifugée à 1000rpm/ 10min/ 4°C. À la fin de la dernière centrifugation, les neutrophiles exempts, de toutes traces

d'hématies contaminantes, sont suspendus dans le HBSS₁ et conservés à basse température afin d'être comptés. Lors de son utilisation, la suspension cellulaire est centrifugée à 1000rpm/ 10min/ 4°C, et les neutrophiles sont récupérés dans le HBSS₂ avec ou sans l'ovalbumine.

2. 3. 2. Comptage des PMNs

Les PMNs isolés sont comptés à l'aide d'une cellule de Thoma en mélangeant 50µl de la suspension cellulaire à 450µl de la solution Turk. Une goutte de la suspension colorée est ensuite déposée contre une lamelle montée sur la cellule de Thoma. Les neutrophiles sont comptés dans les 16 carreaux de la cellule sous microscope (Zeiss, Germany) avec l'objectif X40. La concentration cellulaire est estimée par la formule suivante:

$$[C] = N_0 \times 10 \times 10^4$$

- [C]: Concentration cellulaire (cellule/ml).
- N₀: Nombre de cellules comptées dans les 16 carreaux.
- 10: Facteur de dilution.
- 10⁴: Facteur de correction utilisé pour obtenir le nombre de cellules dans un volume égal à 1ml.

2. 3. 3. Viabilité et pureté des PMNs

La viabilité des neutrophiles est estimée après chaque isolement par le test de l'exclusion au bleu de Trypan. Pour cela, 300µl de la suspension cellulaire sont incubés pendant 10min à 37°C avec 300µl du bleu de Trypan 0.4%. Contrairement aux cellules mortes, les cellules vivantes ont la propriété de ne pas internaliser le colorant par l'action de leur barrière cytoplasmique active. Après coloration, les cellules mortes se colorent en bleu, tandis que les cellules vivantes restent incolores. Les cellules viables et les cellules non viables sont comptées à l'aide de la cellule de Thoma. Le pourcentage de la viabilité est défini par la formule suivante:

$$\% \text{ Viabilité} = (N_t - N_m / N_t) \times 100$$

- N_t: Nombre total de cellules comptées (vivantes et mortes).
- N_m: Nombre de cellules mortes.

La pureté de neutrophiles est définie comme étant le nombre de neutrophiles parmi les 100 cellules aléatoirement comptées pratiquement sur un frottis. Une goutte de suspension cellulaire est étalée sur une lame en verre et fixée par le méthanol pendant 5min. Après 2min

de coloration par le Wright Stain, l'excès du colorant est éliminé par le rinçage avec un tampon PBS et les cellules sont ensuite comptées.

2. 3. 4. Cytotoxicité des extraits de *P. lentiscus*

La cytotoxicité des extraits est évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Pour cela, les neutrophiles (3×10^6 cellule/ml) sont incubés avec les extraits à la concentration $100 \mu\text{g/ml}$ pendant 30min à 37°C . Ensuite, La viabilité est estimée comme précédemment décrit, et exprimée en pourcentage par rapport au contrôle (PMNs non traités) considéré comme le 100% de viabilité.

2. 4. Effet des extraits de *P. lentiscus* sur le chimiotactisme *in vitro*

L'effet des extraits étudiés sur le chimiotactisme des neutrophiles a été évalué à l'aide d'une chambre de chimiotactisme (Neuro, Probe, Inc., USA). Cette chambre est constituée de deux compartiments chacune comporte 48 puits répartis en 12 rangées verticales de 4 puits. Les deux compartiments sont séparés par la silicone gasket, qui a la même distribution en puits que les compartiments de la chambre (Fig. 14). À chaque utilisation, on réserve une rangée pour chaque concentration et on laisse une rangée vide entre deux rangées remplis pour éviter la contamination.

Le chimiotactisme *in vitro* a été réalisé selon la méthode de Falk et ses collaborateurs (1980) modifiée par Selloum *et al.* (2003). Les neutrophiles isolés (2.3×10^6 cellules/ml) sont pré-incubés dans du HBSS₂/ ovalbumine 0.25%, ou avec les différentes concentrations (20- $100 \mu\text{g/ml}$) de chaque extrait à tester pendant 10min à 37°C . Parallèlement, les puits du compartiment inférieur de la chambre sont remplis avec $27 \mu\text{l}$ du HBSS₂/ ovalbumine 0.25% (contrôles négatif) ou avec l'agent chimioattractant, fMLP 10^{-7}M (contrôles positif et test). Un filtre en polycarbonate d'une porosité de $5 \mu\text{m}$ est déposé contre les puits du compartiment inférieur. La silicone gasket est en suite appliquée contre le filtre. La chambre est complètement montée en joignant les compartiments par 6 écrous. Une fois la chambre est surmontée, on dépose $45 \mu\text{l}$ des neutrophiles non traités dans les puits du compartiment supérieur correspondants aux contrôles négatif et positif et $45 \mu\text{l}$ des neutrophiles traités dans les puits tests. Finalement, la chambre est placée pendant 80min dans une étuve à 37°C , en atmosphère humide et en présence de 5% de CO_2 .

À la fin de la période d'incubation, le filtre est retiré et les cellules qui n'ont pas migrées sont éliminées par lavage au tampon PBS. Les cellules ayant adhérées à la face inférieure du filtre sont fixées par le méthanol (5min d'action) et colorées par le Wright Stain (pendant 3min d'action). L'excès du colorant est éliminé par le rinçage du filtre avec l'eau distillée.

Les neutrophiles fixés sur le filtre sont comptés sous microscope à l'objectif X100 en émerison. Pour chaque puits, on compte les cellules contenues dans 5 champs microscopiques choisis aléatoirement. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de cellules de 3 puits pour chaque concentration où ce test est répété 3 fois. Toutefois, la moyenne des cellules des puits contrôles négatifs est soustraite de la moyenne des cellules comptées dans les puits contrôles positifs ainsi que dans les puits tests, afin d'obtenir le nombre de cellules ayant migrées réellement en réponse à l'agent chimioattractant. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la migration des neutrophiles dans les puits tests par rapport à celle des puits contrôles positifs en appliquant la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = (N_C - N_T / N_C) \times 100$$

- N_C : Moyenne du nombre de cellules comptées dans les puits contrôles positifs.
- N_T : Moyenne du nombre de cellules comptées dans les puits tests.

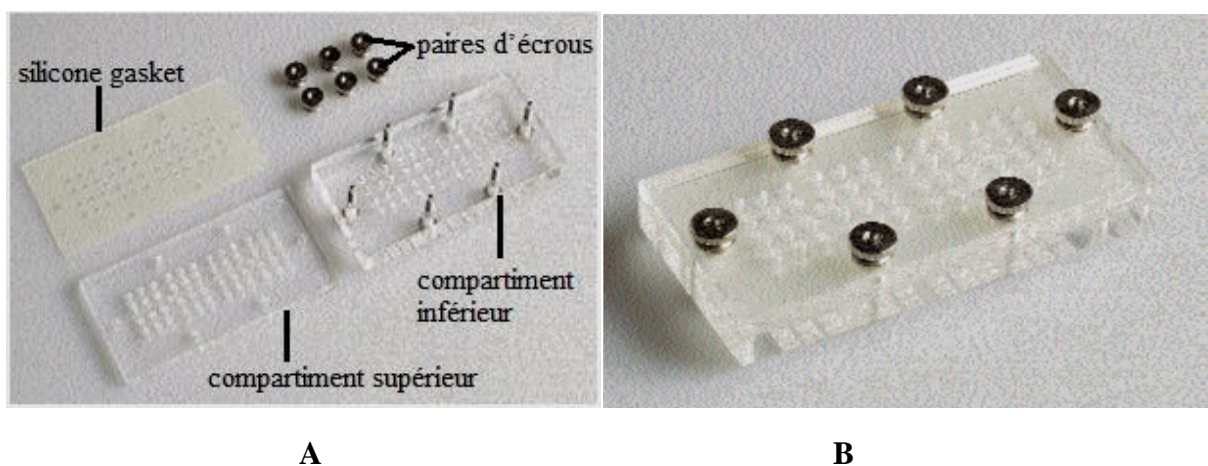


Figure 14. Chambre de chimiotactisme (48-micro Well chemotaxis chamber). **(A)** Les différents constituants de la chambre, le compartiment inférieur est réservé à l'agent chimioattractant et le supérieur est réservé à la suspension cellulaire. **(B)** chambre montée, les deux compartiments sont séparés par la silicone gasket et tous est rassemblé avec 6 écrous.

2. 5. Effets des extraits de *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase

Avant d'investiguer l'effet des extraits de *P. lentiscus* sur la dégranulation des neutrophiles humains isolés, on a évalué leur effet sur l'activité de l'élastase leucocytaire elle-même selon la méthode de Bieth *et al.* (1974). Les neutrophiles suspendus dans du HBSS₂ (6x 10⁶ cellules/ml) sont incubés pendant 20min à 37°C avec fMLP 10⁻⁶M/ Cytochalasine (CB) 10⁻⁵M. Après une centrifugation de 5000rpm/ 25min/ 4°C, le surnageant qui contient l'élastase, est récupéré pour une deuxième incubation de 10min à 37°C avec deux gammes différentes de concentrations (20-100µg/ml et 4-20µg/ml) des trois extraits de *P. lentiscus*. Sur une plaque

transparente de microtitration, 75µl du surnageant traité sont déposés en mélange avec 75µl du substrat spécifique de l'élastase, le *N*-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-*p*-Nitroanilide 5x10⁴M, dilué dans le tampon HEPES 0.1M. Ensuite, la plaque est incubée pendant 40min à 37°C. L'activité de l'élastase est déterminée comme étant l'absorbance à 405nm de *p*-Nitroanilide libéré contre des puits témoins contenant le surnageant non traité et considérés comme 100% d'activité. Toutes les concentrations citées sont des concentrations finales.

2.6. Analyse statistique

Les résultats des différents essais réalisés sont exprimés sous la forme de la moyenne d'inhibition d'au moins trois répétitions ± SEM. La signification statistique entre le contrôle et les échantillons traités est déterminée par le test t de Student et les différences sont considérées significatives au seuil de 5% (p<0.05).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Préparation des extraits de *Pistacia lentiscus*

L'extrait aqueux (E-AQ) des feuilles sèches de *P. lentiscus* se présente sous forme d'une poudre jaune. Tandis que, l'extrait méthanolique (E-Met) de la même partie a une couleur verte-grisâtre. Cependant, l'extrait méthanolique des fruits a une couleur rouge brique attirante. Le rendement d'extraction est exprimé en pourcent de matière sèche. L'extraction méthanolique et aqueuse des feuilles donnent les rendements les plus élevés soit 25.65% et 16.41% respectivement par rapport à l'E-Met des fruits qui présente le rendement le plus faible de 1.68% seulement.

Le rendement obtenu avec l'E-AQ est légèrement plus élevé que le rendement (16%) mentionné dans les travaux de Ljubuncic *et al.* (2005). Ceci peut être expliqué par l'origine géographique de la plante (climat et sol), la saison de la récolte et la durée et les conditions de stockage. Concernant l'E-Met des feuilles, le rendement est supérieur que celui rapporté dans l'étude de Beara *et al.* (2010). Malgré que la méthode d'extraction appliquée aux feuilles et aux fruits soit la même, mais le rendement des fruits est très faible par rapport aux feuilles. Cela est probablement dû aux propriétés génotypiques et au contenu chimique de chaque organe végétal. En plus de la méthode, le système solvant utilisé est l'un des facteurs qui influencent le rendement d'extraction et même la qualité de l'extrait, autrement dit, avec la pureté des principes actifs (Tabart *et al.*, 2007). Pour cette raison, le rendement obtenu avec l'E-Met des feuilles (25.65%) est supérieur à celui rapporté par Benhammou *et al.* (2008) pour l'extrait éthanolique des feuilles (12.64%).

Dans la présente étude, le protocole d'extraction est optimisé afin de préserver la bio-activité des constituants. En effet, la macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact de la matière végétale avec le solvant. Cependant, l'extraction à température ambiante et à pH modéré ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permettent d'obtenir le maximum des composés et de préserver ces composés vis-à-vis des modifications chimiques (Tabart *et al.*, 2007).

2. Dosages des polyphénols et des flavonoïdes

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) sont les éléments phytochimiques qui présentent les effets pharmacologiques les plus importants des plantes. Pour cela, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des 3 extraits étudiés de *P. lentiscus* a été effectué.

La quantification des composés phénoliques dans les 3 extraits a été estimée par la méthode du réactif de Folin et la teneur en composés phénoliques est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (AG) utilisé comme standard (Fig. 15).

Le dosage des flavonoïdes est déterminé selon la méthode au trichlorure d'aluminium. La courbe d'étalonnage de la quercétine (Fig. 16) est utilisée pour calculer le contenu en flavonoïdes de chaque extrait. Les résultats obtenus sont exprimés respectivement en microgramme d'équivalent d'acide gallique (EAG/mg d'extrait) et d'équivalent de quercétine (EQ/mg d'extrait) pour chaque extrait (Tableau 2).

Tableau 2. Quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits de *P. lentiscus*. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM ($n=3$).

Extrait	Polyphénols $\mu\text{g d'EAG/mg d'extrait}$	Flavonoïdes $\mu\text{g d'EQ/mg d'extrait}$
E-AQ feuilles	227 ± 0.34	11 ± 0.12
E-Met feuilles	268 ± 0.69	15 ± 0.06
E-Met fruits	214 ± 0.34	24 ± 0.42

Les résultats du tableau 2 montre que l'E-Met des feuilles est plus riche en polyphénols que l'E-AQ des feuilles et que l'E-Met des fruits qui étant le moins riche des 3 extraits. Par contre, l'E-Met des fruits présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes. Cependant, les flavonoïdes des feuilles sont mieux extraits par le méthanol que par l'eau.

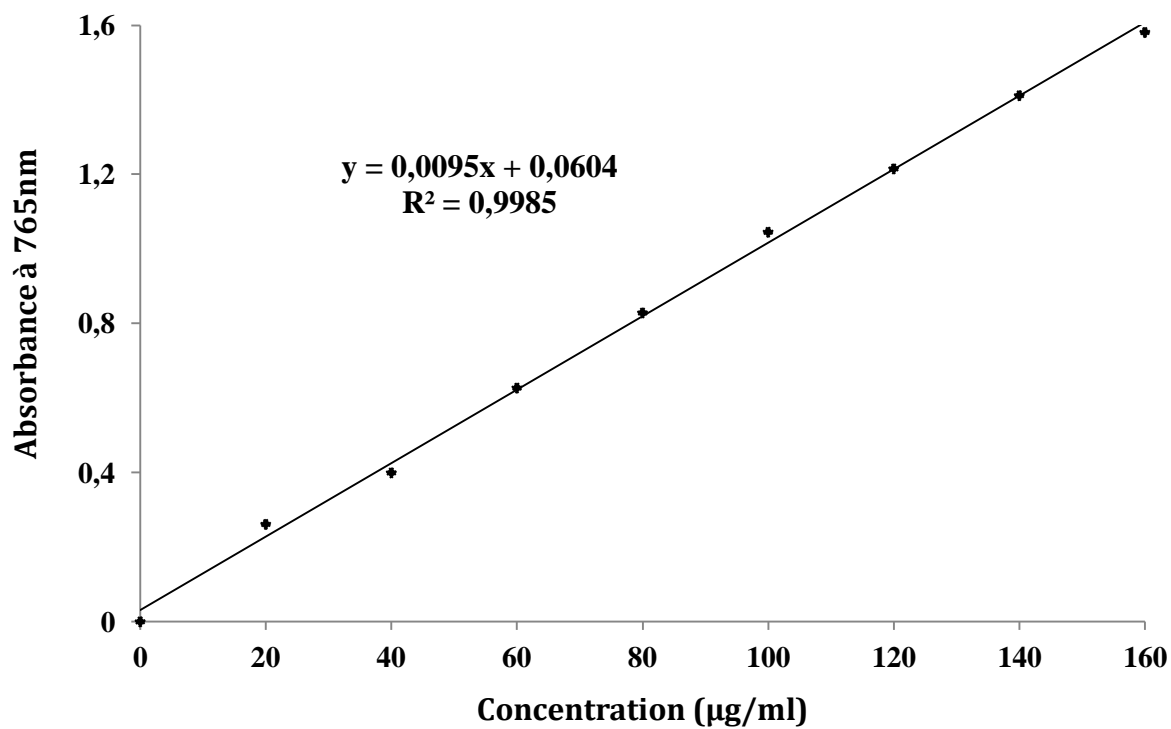


Figure 15. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

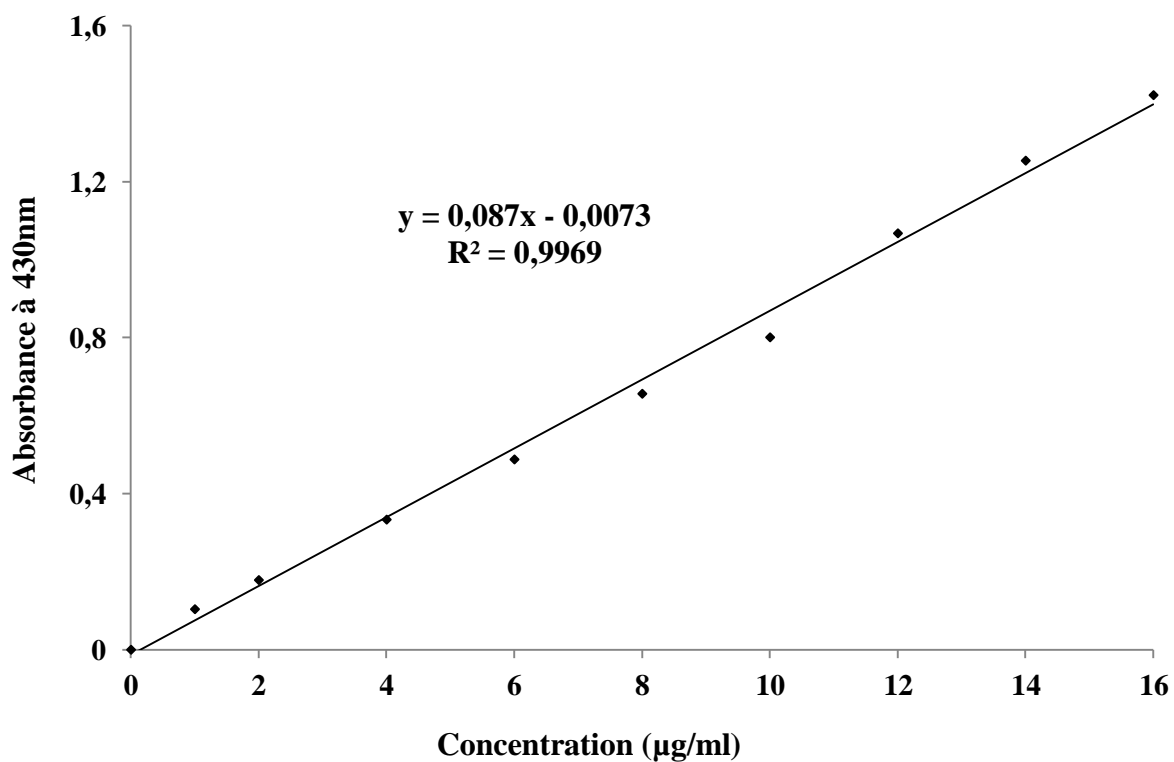


Figure 16. Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Le contenu des fruits de *P. lentiscus* en flavonoïdes ($24 \pm 0.42 \mu\text{g EQ} / \text{mg E}$) est identique à celui trouvé ($23 \pm 1 \mu\text{g EQ} / \text{mg E}$) dans les fruits de *P. terebinthus* (Topçu *et al.*, 2007). Cependant, les fruits de *P. lentiscus* contiennent plus de polyphénols que ceux de *P. terebinthus* ($123 \pm 0.02 \mu\text{g PE/mg E}$), où le pyrocatechol (PE) a été utilisé comme standard (Topçu *et al.*, 2007). En outre, les travaux réalisés par Maamri (2008) sur les fruits et les feuilles de *P. atlantica* permettent d'affirmer que les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes chez *P. lentiscus* sont élevées par rapport à *P. atlantica* dans les deux organes, et que les feuilles des deux espèces de *Pistacia* sont plus riches en composés phénoliques que les fruits.

Pour les composés phénoliques, le choix du solvant (la combinaison méthanol/eau) peut améliorer l'extraction des composés de moyenne et de faible polarité plus que les composés phénoliques glycosidés qui sont très hydrosolubles (Lapornik *et al.*, 2005). Les études de Romani et ses collaborateurs (2002) ont montré qu'en plus des flavonoïdes glycosidés tels que les glycosides de myricétine et de quercétine, les feuilles de *P. lentiscus* se renferment de grandes quantités d'acide gallique et de dérivés galloyl. En outre, Il a été rapporté que les fruits de *P. lentiscus* sont riches en flavonoïdes glycosides tels que le cyanidine 3-O-glucoside, le delphinidine 3-O-glucoside et cyanidine 3-O-arabinoside en plus des dérivés de l'acide gallique comme 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose, qui peuvent être les précurseurs des tannins (Romani *et al.*, 2002; Longo *et al.*, 2005).

La présence des flavonoïdes est plus importante dans les fruits de cette plante que dans ses feuilles. De ce point de vue, nos résultats se différencient de ceux obtenus par Maamri (2008) et Yousfi *et al.* (2009). L'utilisation d'un milieu d'extraction acidifié (méthanol/HCl 0.1%) permet d'extraire des tannins et des flavonoïdes où l'acidification du milieu pourrait augmenter la stabilité des flavonoïdes tels que les anthocyanines. De plus, elle favorise la dissociation des acides hydroxycinnamiques et accélère la dégradation des procyanidines par l'hydrolyse des polymères et des constituants qui forment les enveloppes de fruits. Enfin, le méthanol acidifié peut altérer l'intégrité des parois et des membranes cellulaires ce qui facilite la solubilisation et la diffusion des composés phénoliques des fruits dans le milieu d'extraction (Ju et Howard, 2003; Chirinos *et al.*, 2007).

3. Préparation des neutrophiles humains

Les neutrophiles sont les cellules immunitaires principales qui interviennent au site affecté dans les inflammations. Toutefois, les PMNs sont potentiellement liés à la pathophysiologie de nombreux syndromes inflammatoires. L'action délétère de ces cellules est associée à l'activation excessive, la dérégulation et la surproduction de radicaux libres et des enzymes protéolytiques qui sont fortement toxiques aux tissus environnants (Costa *et al.*, 2006; Mumy et McCormick, 2009). Nombreuses expérimentations ont utilisé les neutrophiles isolés comme modèle cellulaire *in vitro* afin d'évaluer la suppression ou la modulation de l'activation excessive et inappropriée des PMNs par les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens, ainsi que par plusieurs plantes médicinales présentant des propriétés anti-inflammatoires (Hwang *et al.*, 2006).

La méthode suivie pour l'isolement des PMNs a permis d'obtenir jusqu'à 3 millions de cellules par ml de sang. L'efficacité de cette méthode est vérifiée par la viabilité et la pureté de la suspension cellulaire. La viabilité des cellules isolées a été estimée à plus de 94% dont plus de 95% sont des neutrophiles.

3.1. Effet cytotoxique des extraits de *P. lentiscus*

La cytotoxicité des extraits appliqués envers les neutrophiles a été évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Les PMNs sont incubés avec les extraits des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* à des concentrations allant jusqu'à 100µg/ml et avec le DMSO (0.1%) pendant 30 min. La viabilité obtenue est supérieure à 75%. Ces résultats montrent l'absence d'effet cytotoxique pour les concentrations d'extraits appliqués contre les neutrophiles humains au cours de ce travail. Il est donc exclu que tout effet inhibiteur de ces extraits soit dû à leur cytotoxicité.

4. Etude du chimiotactisme des neutrophiles humains

L'effet des 3 extraits de *P. lentiscus* sur la réponse chimiotactique des neutrophiles humains a été évalué *in vitro* à l'aide d'une chambre du chimiotactisme (48-Well chemotaxis chamber). Les neutrophiles (2.3×10^6 cellules/ml) sont incubés dans les puits supérieurs de la chambre en présence ou en absence des différentes concentrations des substances à tester. Les PMNs vont migrer à travers les pores du filtre en polycarbonate vers les puits inférieurs de la chambre qui renferment soit le HBSS₂ seul qui représente le contrôle négatif (Fig. 17A), soit le milieu avec l'agent chimioattractant fMLP 10^{-7} M pour les puits contrôle positif (Fig. 17B) et les puits tests. Les résultats montrent qu'en présence de l'agent chimioattractant (Fig. 18), le nombre

des neutrophiles qui migrent est au moins 3 fois plus grand (74 ± 4) qu'en son absence (22 ± 3). La différence notée est statistiquement très significative ($p < 0.01$).

Sous l'effet des facteurs chimioattractants, les neutrophiles stimulés se déplacent d'une manière unidirectionnelle guidés par le gradient décroissant de ces chimioattractants générés au niveau du site enflammé (Salvatisi *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2008). Les résultats obtenus suggèrent que l'exposition des neutrophiles au fMLP active fortement leur réponse chimiotactique où ils ont migré en très grand nombre. Par contre, en absence de chimioattractants, les neutrophiles se déplacent d'une manière spontanée, pluridirectionnelle et ne s'éloignent pas significativement de leurs sites initiaux (Jin *et al.*, 2008), ce qui explique le faible nombre de neutrophiles ayant migré vers les puits inférieurs qui ne renferment pas du fMLP.

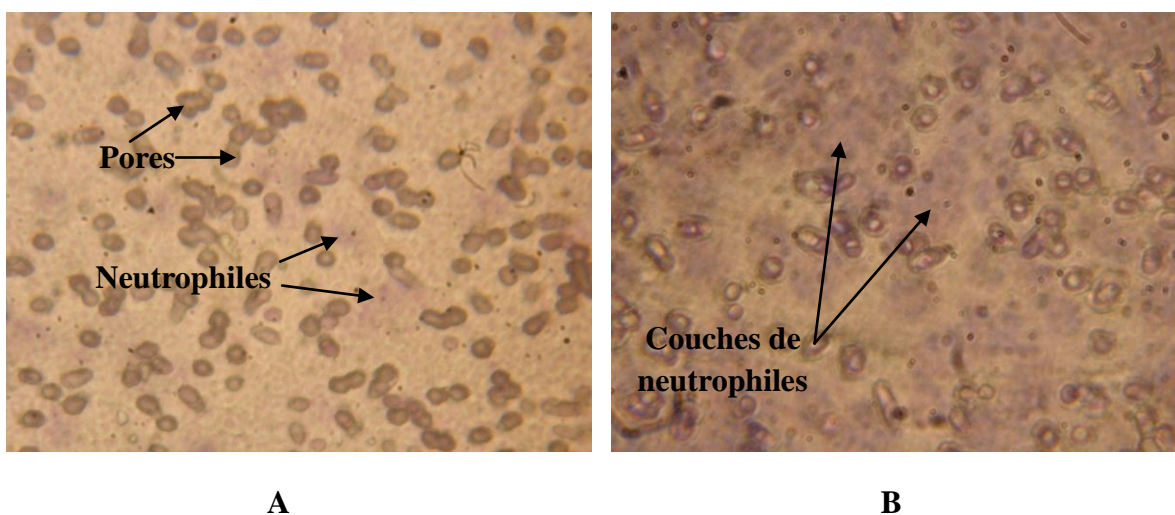


Figure 17. Adhésion des neutrophiles humains sur le filtre après leur migration en absence (A) et en présence du fMLP (B). Les neutrophiles (2.3×10^6 cellules/ml) sont incubés pendant 80 min à 37°C dans le HBSS₂ contenant 0.25% d'ovalbumine, dans un milieu humide et riche en CO₂. Après incubation, les cellules sont fixées sur le filtre de polycarbonate en présence de méthanol et colorées par le Wright Stain, la lecture s'effectue à l'objectif X40.

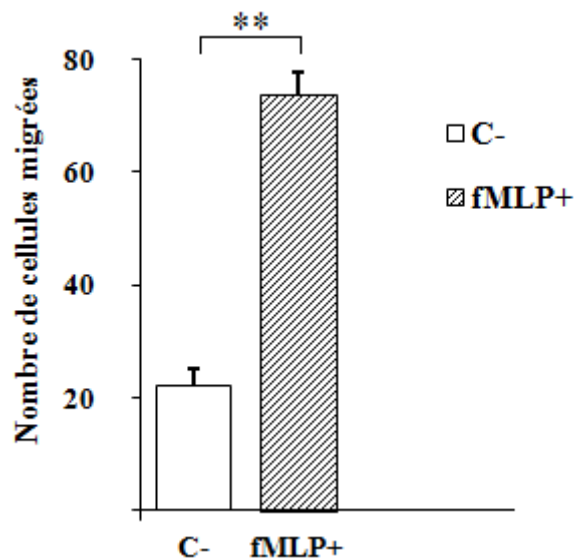


Figure 18. Effet chimioattractant du fMLP (10^{-7} M) sur les PMNs humains isolés. Les PMNs fraîchement isolés sont incubés pendant 80 min à 37°C dans une atmosphère humide et riche en CO_2 . Les PMNs ayant adhéré à la face inférieure du filtre sont comptés à l'objectif X100 après leur fixation sur le filtre par le méthanol et leur coloration avec le Wright Stain. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par champ. Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM ($n=3$). Contrôle négatif (C-) vs l'fMLP; ** $p < 0.01$ (test t de Student).

4.1. Effet des extraits méthanoliques de *P. lentiscus* sur le chimiotactisme

Le traitement des neutrophiles avec différentes concentrations des extraits méthanoliques des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* (20-100 $\mu\text{g/ml}$) a réduit significativement leur migration induite par le fMLP (Fig. 19). Les inhibitions obtenues sont positivement corrélées à la concentration des extraits. Cependant, le chimiotactisme des PMNs en réponse au fMLP est complètement réprimé en présence de 100 $\mu\text{g/ml}$ d'E-Met des fruits (la concentration la plus élevée sans effet cytotoxique), et le pourcentage d'inhibition est de 100%.

4.2. Effet des extraits des feuilles de *P. lentiscus* sur le chimiotactisme

Comme l'E-Met des feuilles, l'E-AQ de *P. lentiscus* (20-100 $\mu\text{g/ml}$) a reprimé d'une manière dose-dépendante le chimiotactisme des PMNs en réponse au fMLP (Fig. 20). Les inhibitions engendrées par ces extraits à 100 $\mu\text{g/ml}$ sont pratiquement proches et atteignent un taux maximal de 71% et de 81% pour l'E-AQ et l'E-Met des feuilles, respectivement.

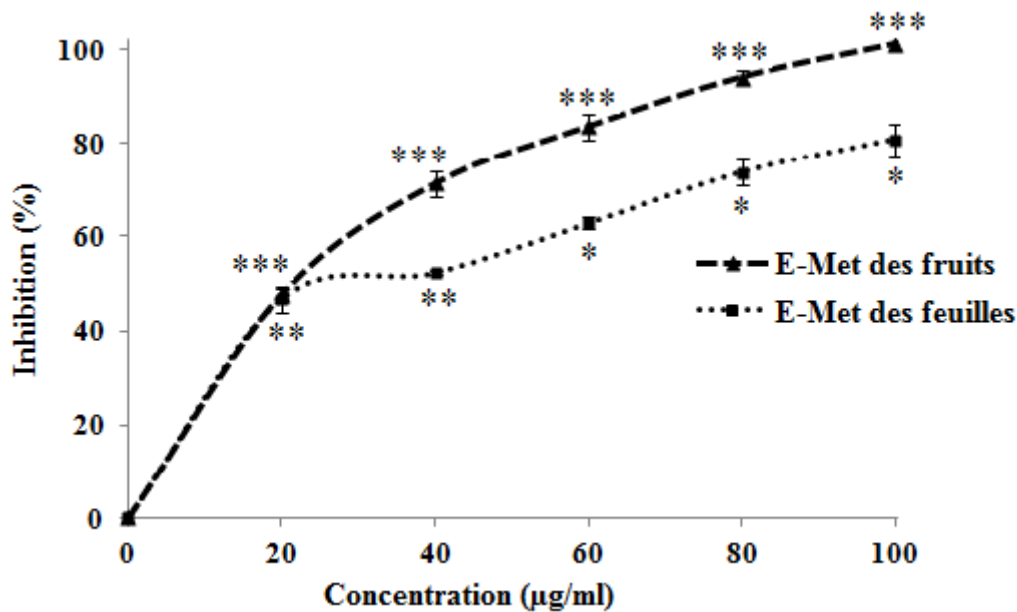


Figure 19. Effet des extraits méthanoliques de *P. lentiscus* sur le chimiotactisme des neutrophiles humains activés par le fMLP. Les neutrophiles sont incubés à 37°C pendant 80 min en présence de 20 à 100µg/ml des extraits méthanoliques (E-Met) des fruits et des feuilles. Les valeurs représentent les pourcentages d'inhibition de la migration des neutrophiles par rapport au contrôle considéré comme le 100% de migration. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle positif ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (test t de Student).

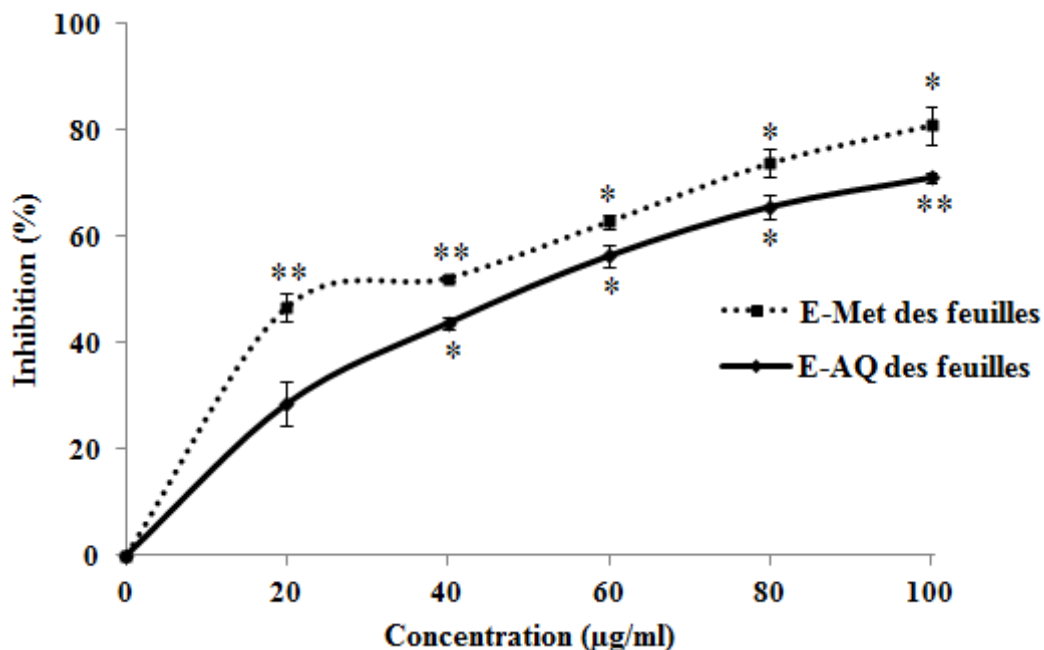


Figure 20. Effet des extraits des feuilles de *P. lentiscus* sur la migration des neutrophiles humains stimulés par le fMLP. Les neutrophiles isolés sont incubés à 37°C pendant 80 min en présence de 20 à 100µg/ml d'extrait méthanolique (E-Met) et aqueux (E-AQ) des feuilles. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la migration des neutrophiles par rapport au contrôle considéré comme le 100% de migration. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test t de Student).

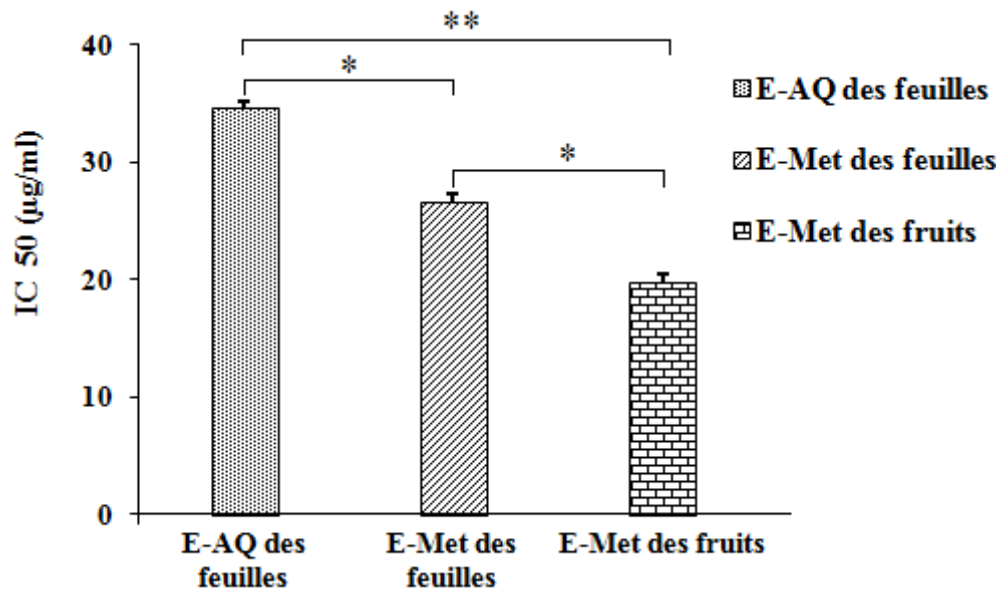


Figure 21. IC₅₀ des extraits de *P. lentiscus* durant la migration des neutrophiles humains stimulés par le fMLP. Chaque histogramme représente la moyenne ± SEM ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées entre les trois extraits ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test d'ANOVA).

L'extrait méthanolique des fruits de *P. lentiscus* semble avoir un pouvoir inhibiteur plus fort sur la migration des PMNs que l'E-Met et l'E-AQ des feuilles, et les IC₅₀ enregistrées sont respectivement de 19.8 ± 0.8 , 26.7 ± 0.7 et $34.6 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$. La figure 21 montre une différence très significative ($p < 0.01$) entre l'effet anti-chimioattractant de l'E-Met des fruits et celui de l'E-AQ des feuilles et une différence significative ($p < 0.05$) notée aussi entre l'E-Met et l'E-AQ des feuilles.

Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique des feuilles de *P. lentiscus* inhibe mieux le chimiotactisme que l'extrait aqueux, ce qui peut être dû à la présence de substances à faible polarité dans l'extrait méthanolique qui peuvent agir en synergie avec les substances hydrosolubles (Lapornik *et al.*, 2005; Seidle, 2002). Par ailleurs, l'extrait méthanolique des fruits exerce un effet inhibiteur plus fort que celui exercé par le même extrait des feuilles, ce qui indique que les composés responsables de cette inhibition présentent aussi bien dans les fruits que dans les feuilles de la plante. Dans la présente étude, l'analyse chimique des extraits de *P. lentiscus* montre que ses fruits sont la plus riche en flavonoïdes par rapport aux feuilles. Ces molécules constituent une grande classe des polyphénols qui sont largement distribuées dans le règne végétal. Nombreuses études phyto-thérapeutiques affirment que les activités anti-inflammatoire et antioxydante des plantes pourraient être attribuées à leur contenu en flavonoïdes qui semblent des effets bénéfiques sur l'inflammation (Li *et al.*, 2000; Bouriche *et al.*, 2003). Dans ce contexte, l'activité anti-inflammatoire de la rutine, l'isomère glycosylée de la quercétine, a été étudiée *in vivo* et *in vitro*. Pratiquement, la rutine a exercé un effet

inhibiteur significatif ($p < 0.05$) et d'une manière dose-dépendante sur le chimiotactisme des neutrophiles humains en réponse au fMLP (Selloum *et al.*, 2001).

La capacité des flavonoïdes à moduler la réponse chimiotactique chez les neutrophiles a été investiguée et toutefois les mécanismes fondamentaux, avec les quels ces composés agissent, ne sont pas encore bien déterminés. Plusieurs études indiquent que les flavonoïdes pourraient exercer un effet inhibiteur direct sur des enzymes impliquées dans les voies de signalisation au sein du neutrophile comme la PKC et la PI3-kinase (Gamet-Payraastre *et al.*, 1999; Selloum *et al.*, 2001) où la PI3-Kinase joue un rôle principal dans la réorganisation du cytosquelette d'actine durant le chimiotactisme et dans la dégranulation de PMNs stimulés (Burelout *et al.*, 2007; Millius *et al.*, 2009). Récemment, Souto *et al.* (2011) montrent, *in vivo* et *in vitro*, que la quercétine peut inhiber d'une manière dose-dépendante le chimiotactisme des neutrophiles stimulés par différents chimioattractants, parmi lesquels le fMLP, probablement en réduisant la polymérisation d'actine.

Par ailleurs, les activités anti-inflammatoires exercées par les flavonoïdes peuvent être dues aussi à l'inhibition de certaines enzymes qui peuvent amplifier le processus inflammatoire, parmi ces enzymes la cyclooxygénase (Cox-2) et la lipoxigénase (Lox-5), en réduisant alors la production des médiateurs pro-inflammatoires tels que les prostaglandines (Surh *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2007). De plus, les anthocyanines, composés poly-phénoliques donnent aux fruits de *P. lentiscus* une couleur bleu-rougeâtre, peuvent expliquer l'activité anti-chimioattractant de ces fruits. Le delphinidine, anthocyanine aglycone, inhibe efficacement la phosphorylation de certaines enzymes kinases comme la JNK, p38-kinase, PI3-kinase et aussi bien la Fyn kinase qui sont impliquées dans l'activation des facteurs de transcription au niveau du gène codant la Cox-2 (Hwang *et al.*, 2009).

Janakat et Al-Merie (2002), dans une étude *in vivo* sur rats, ont montré que l'extrait aqueux bouilli ou non des feuilles de *P.lentiscus* possède un effet anti-inflammatoire et hépatoprotectif. Ces mêmes résultats ont été trouvés par Ljubuncic *et al.* (2005) qui suggèrent que ceci peut être dû principalement aux composés phénoliques, aux flavonoïdes glycosides et aux tannins condensés de la plante. En outre, les polyphénols peuvent affecter la production des nombreux cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'interféron γ et l'IL-1 β dans différents cellules et tissus (Canali *et al.*, 2000).

5. Etude de l'activité de l'élastase leucocytaire

L'inhibition de l'activité de l'élastase libérée par les granules des neutrophiles est évaluée en utilisant un substrat spécifique (*N*-Méthoxy-Suc-(Ala)₂-Pro-Val-*p*-Nitroanilide) pour mesurer l'apparition du produit (*p*-Nitroanilide). La dégranulation chez les PMNs humains a été préalablement stimulée par le fMLP/CB. Après être récupéré, le surnageant contenant la HNE est pré-incubé en présence de 20 à 100µg/ml des extraits à étudier de *P. lentiscus* et l'absorbance de la *p*-Nitroanilide libérée par l'élastase leucocytaire est mesurée à 405nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de cette activité par rapport au contrôle non traité qui représente le 100% d'activité.

Les trois extraits ont inhibé très significativement ($p < 0.01$) l'activité catalytique de l'élastase récupérée. À partir de 40µg/ml de chaque extrait, cette inhibition reste stable formant un plateau à une valeur de 69% et 79% pour l'E-AQ et l'E-Met des feuilles, et de 89% pour l'E-Met des fruits (Fig. 22). À dose de 100µg/ml, cette inhibition atteint son maximum de 82, 90 et 94% pour l'E-AQ, l'E-Met des feuilles et des fruits, respectivement. Les concentrations des extraits sont élevées ce qu'a engendré une forte inhibition de la HNE.

À la lumière de ces résultats, nous avons abaissé la gamme de concentrations afin d'éviter l'effet inhibiteur intense des extraits de *P. lentiscus* sur l'activité de la NHE. Dans ce contexte, l'élastase récupérée a été traitée par des concentrations de 4 à 20µg/ml de chacun des extraits.

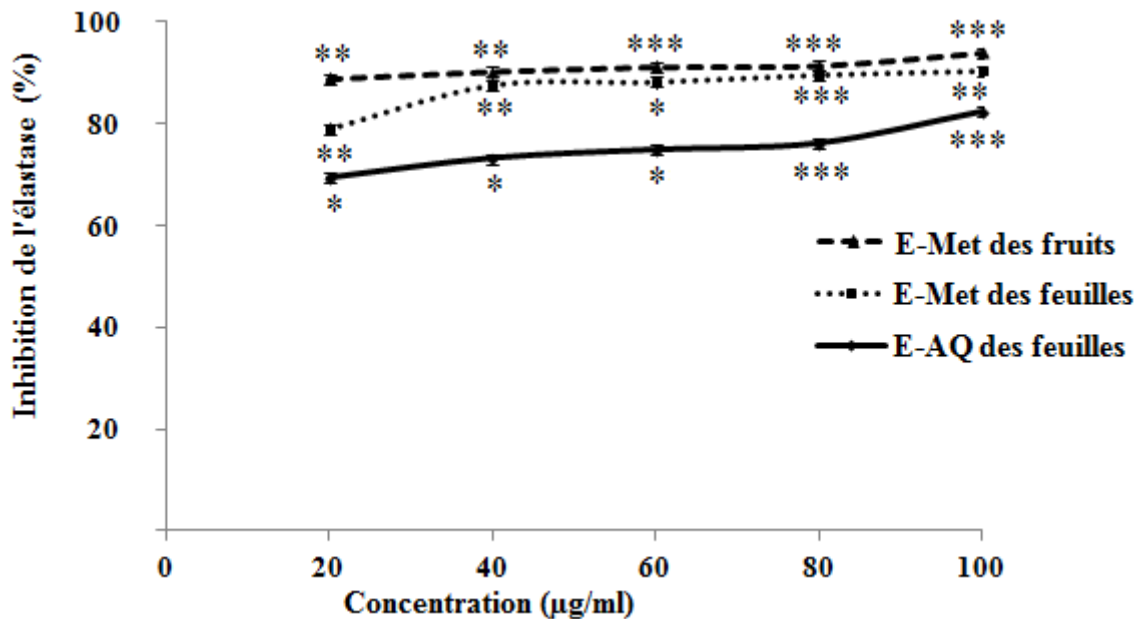


Figure 22. Effet des extraits de *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase leucocytaires. Le surnageant, contenant l'élastase libérée par les PMNs en réponse au fMLP/CB, est incubé pendant 10min à 37°C avec différentes concentrations (20-100µg/ml) des extraits. L'activité de l'élastase est estimée en mesurant l'absorbance du *p*-nitroanilide libéré dans le milieu réactionnel à 405nm. Les résultats (moyenne ± SEM) sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique de l'élastase par rapport au contrôle non traité qui représente le 100% d'activité ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (test t de Student).

5.1. Effet des extraits de *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase

Lorsque la HNE a été traitée par différentes concentrations des 3 extraits de *P. lentiscus* (4-20µg/ml), son activité catalytique est réduite significativement ($p < 0.05$) et de manière dose-dépendante. À concentration de 4µg/ml de l'E-Met des feuilles et des fruits, l'apparition de la *p*-nitroanilide est fortement inhibée avec un taux de 25% et de 34%, respectivement. Cette inhibition est par la suite augmenté avec le reste des concentrations de chaque extrait jusqu'à 79% et 92%, respectivement (Fig. 23).

Contrairement à l'E-Met des feuilles, l'E-AQ (4-20µg/ml) a inhibé légèrement l'activité catalytique de l'élastase leucocytaire et présenté un taux d'inhibition minimal de 11%, à concentration de 4µg/ml. À dose de 20µg/ml, l'effet anti-élastasique de cet extrait atteint au maximum 70% (Fig. 24).

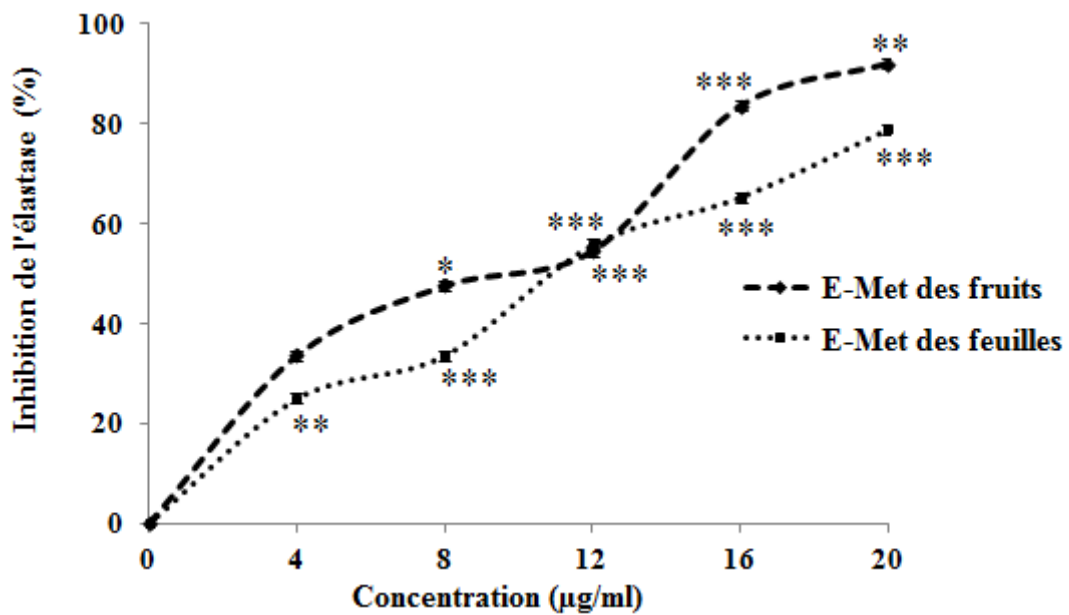


Figure 23. Comparaison entre les effets inhibiteurs d'extraits méthanoliques des des feuilles et de fruits *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase leucocytaire. Les conditions expérimentales sont les mêmes. L'inhibition de l'élastase est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle qu'est non traité et considéré comme le 100% d'activité. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (test t de Student).

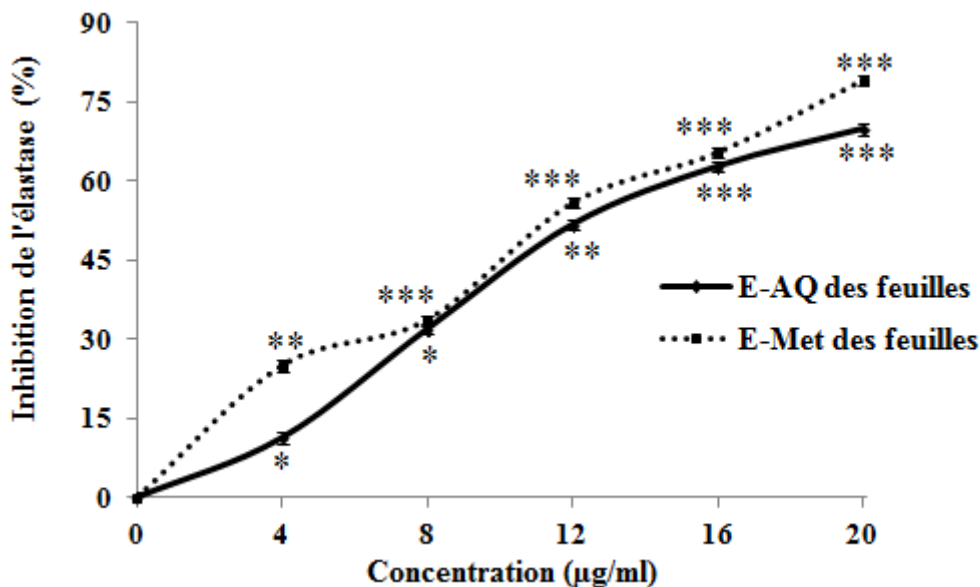


Figure 24. Comparaison entre l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles de *P. lentiscus* sur l'activité de l'élastase leucocytaire. Les conditions expérimentales exercées sur ces concentrations sont les mêmes que celles appliquées sur la gamme de 20 à 100µg/ml. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'élastase par rapport au contrôle considéré comme le 100% d'activité et présents sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (test t de Student).

La figure 25 montre que l'inhibition engendrée par l'E-AQ des feuilles est significativement ($p < 0.05$) faible que celle exercée par l'E-Met. Dans ce cas, les valeurs des l'IC₅₀ sont de $13.7 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ pour l'E-AQ et de $11.5 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ pour l'E-Met des feuilles. Cependant, l'E-Met des fruits a donné le même effet inhibiteur puisant des feuilles, avec une valeur d'IC₅₀ égale à $10.7 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$.

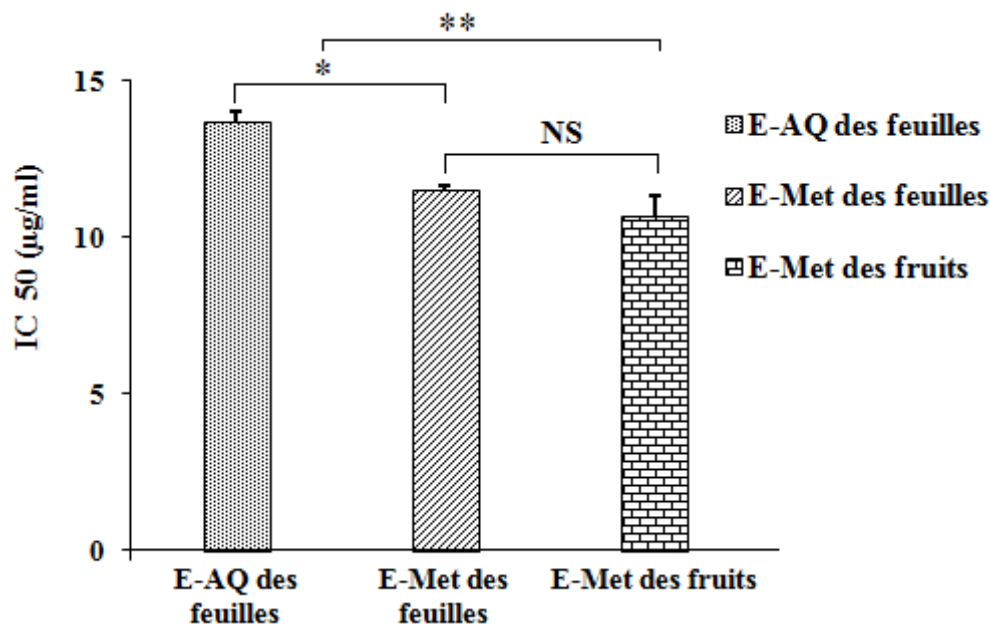


Figure 25. IC₅₀ des trois extraits *P. lentiscus* de l'élastase leucocytaire libérée de neutrophiles humains stimulés par le fMLP/CB. Chaque histogramme représente la moyenne ± SEM ($n = 3$). Les comparaisons sont effectuées entre les trois extraits ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; NS différence non significative (test d'ANOVA).

L'élastase appartenant à la famille des chymotrypsines est stockée sous forme active dans les granules azurophiles avec les autres enzymes protéolytiques (Kim *et al.*, 2004; Garwicz *et al.*, 2005). Dans de nombreuses études, l'activité de l'élastase libérée par les PMNs stimulés est utilisée comme marqueur de la dégranulation de ces cellules (Hwang *et al.*, 2010).

Durant l'inflammation, l'élastase joue un rôle important dans l'élimination des bactéries comme elle peut dégrader les protéines structurales au site infecté. La libération locale excessive de la NHE peut provoquer des dommages tissulaires irréversibles, conduisant aux divers syndromes inflammatoires (Kim *et al.*, 2004; Siedle *et al.*, 2007).

Comme dans le cas du chimiotactisme, les extraits méthanoliques des fruits et des feuilles de *P. lentiscus*, à des faibles concentrations (4 à 20 µg/ml), exercent une inhibition dose-dépendante sur l'activité de l'élastase leucocytaire récupérée à partir de PMNs-fMLP/CB stimulés. Par ailleurs, l'extrait aqueux des feuilles montre un effet anti-élastasique plus faible que celui des deux extraits méthanoliques. Dans tous les cas, l'inhibition enzymatique engendrée par les trois extraits est importante, ce qui pourrait être du à leur contenu en

molécules bioactives. L'analyse de la composition chimique de *P. lentiscus* montre que les extraits étudiés contiennent une teneur considérable en polyphénols et en flavonoïdes. Longo et ses collaborateurs (2007) ont affirmé aussi la présence des précurseurs de tannins condensés, principalement les dérivés glycosides des anthocyanidines dans les extraits méthanoliques des fruits et même des feuilles. La présence des précurseurs de tannins hydrolysables comme les dérivés de l'acide gallique et de galloylglucose a été également rapportée (Abdelwahed *et al.*, 2007).

Les tannins de *P. lentiscus* sont probablement impliqués dans la modulation de certaines fonctions effectrices de neutrophiles. Piwowarski et ses collaborateurs (2011) ont rendu l'effet inhibiteur des tannins condensés sur le pouvoir catalytique de l'élastase leucocytaire à leur propriété de précipiter cette protéine enzymatique, d'une manière non spécifique. En outre, les procyanidines peuvent établir des liaisons électrostatiques et d'hydrogène au niveau du site catalytique de la NHE, ce qui peut l'inhiber efficacement (Maffei-Facino *et al.*, 1994; Packer *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004). Les flavonoïdes exhibent également un effet anti-élastasique, soit en inhibant cette enzyme directement par un mécanisme qui n'est pas clair jusqu'à présent, soit indirectement *via* leur activité anti-oxydante. En effet, ces molécules bioactives piègent certains radicaux libres afin de protéger l'activité inhibitrice de l' α -antitrypsine, l'inhibiteur spécifique de la HNE (Hagio *et al.*, 2001; Bouriche *et al.*, 2007). Selon Sartor *et al.* (2002), la présence ou l'absence des groupements hydroxyles et des doubles liaisons dans la structure des flavonoïdes jouent un rôle crucial dans leur capacité inhibitrice envers la HNE. De plus, les groupes glycosidiques, sur le squelette des flavones, peuvent affecter la conformation stérique de la NHE et mener à des interactions enzyme-phénols, en conséquence à l'inhibition de son activité protéolytique (Sartor *et al.*, 2002).

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons quantifié d'abord le contenu en composé phénoliques et en flavonoïdes des extraits (aqueux et méthanolique) des feuilles et de l'extrait méthanolique des fruits de *Pistacia lentiscus*. Ensuite, l'effet anti-inflammatoire des extraits a été étudié *in vitro* sur les neutrophiles humains stimulés. Leur effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de l'élastase leucocytaire a été également évalué.

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits étudiés montre que les fruits de *P. lentiscus* sont plus riches en flavonoïdes que les feuilles. Par contre, les feuilles possèdent la teneur la plus élevée en composés phénoliques.

Les deux extraits méthanoliques, des fruits et des feuilles, de *P. lentiscus* inhibent le chimiotactisme des neutrophiles-fMLP stimulés plus fortement que l'extrait aqueux. Cependant, cet extrait aqueux, lui-même, montre une activité anti-chimiotactique importante.

En outre, l'inhibition de l'activité catalytique d'élastase leucocytaire récupérée (dégranulation -fMLP/CB stimulée) est clairement prouvée pour les 3 extraits étudiés. À chaque fois, ces extraits exercent un effet inhibiteur potentiel sur l'élastase leucocytaire où l'extrait méthanolique des fruits semble avoir un bon pouvoir inhibiteur.

Les résultats obtenus, permettent de conclure que *P. lentiscus* possède des capacités anti-inflammatoires louables. De plus, cette plante, et surtout ses fruits, peut constituer une source naturelle importante de molécules bioactives qui agissent en tant qu'anti-chimiotactant et en tant qu'inhibiteur efficace de l'élastase leucocytaire. Cependant, des études complémentaires approfondies sont nécessaires pour:

- Identifier précisément le (ou les) principe actif présent dans les extraits de *P. lentiscus*.
- Comprendre les mécanismes moléculaires avec lesquelles ces molécules bioactives agissent et à quel niveau.
- Déterminer les voies de signalisation cibles au sein du neutrophile de cette (ou ces) molécule bioactive.
- Evaluer les activités anti-inflammatoires de cette plante par différents tests *in vivo* et *in vitro*.

L'évaluation de l'effet anti-dégranulant de *P. lentiscus*, lui-même, n'est pas très intéressante *via* le dosage de l'activité élastasique. En conséquence, son effet anti-dégranulant pourrait être déterminé *via* une autre enzyme qui pourrait servir comme indicateur de la dégranulation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdelwahed A., Bouhlel I., Skandrani I., Valenti K., Kadri M., Guiraud P., teiman R., Mariotte A.M., Ghedira K., Laporte F., Dijoux-Franca M.G. et Chekir-Ghedira L. (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**: 1-13.
- Adams M., Plitzko I., Kaiser M., Brun R. et Hamburger M. (2009). HPLC-profiling for antiplasmodial compounds-3-Methoxycarpachromene from *Pistacia atlantica*. *Phytochemistry Letters* **2**: 159-162.
- Alam S.R., Newby D.E. et Henriksen P.A. (2011). Role of the endogenous elastase inhibitor, elafin, in cardiovascular injury From epithelium to endothelium. *Biochemical Pharmacology* (**In press.**)
- Allen L.-A.H. et Aderem A. (1996). Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in Immunology* **8**: 36-40.
- Al-Said M.S., Aggel A.M., Parmar N. et Tariq M. (1986). Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J Ethnopharmacol* **15**: 271-278.
- Aprikyan A.A.G. et Dale D.C. (2001). Mutations in the neutrophil elastase gene in cyclic and congenital neutropenia. *Current Opinion in Immunology* **13**: 535-538.
- Ariel A., Yavin E.J., HersHKoviz R., Avron A., Franitza S., Hardan I., Cahalon L., Fridkin M. et Lider O. (1998). IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *Journal of Immunology* **161**: 2465-2472.
- Artoli A.M., Sequeira A., Silva-Herdade A.S. et Saldanha C. (2007). Leukocytes rolling and recruitment by endothelial cells:hemorheological experiments and numerical simulations. *Journal of Biomechanics* **40**: 3493-3502.
- Baetta R. et Corsini A. (2010). Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives. *Atherosclerosis* **210**: 1-13.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luyckx M. et Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung* **46**: 1086-1089.
- Bank U., Kupper B., Reinhold D., Hoffman T. et Ansorge S. (1999). Evidence for a crucial role of neutrophil-derived serine proteases in the inactivation of interleukin-6 at sites of inflammation. *FEBS Letters* **461**: 235-240.
- Baratto M.C., Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Romani A., Visioli F., Basosi R. et Pogni R. (2003). Antioxidant Activity of Galloyl Quinic Derivatives Isolated from *P. lentiscus* Leaves. *Free Radical Research* **4**: 405-412.
- Bartolucci C., Cellai L., Iannilli M.A., Lamba D., Liverani L., Mascellani G. et Perola E. (1995). Inhibition of human leukocyte elastase by chemically and naturally oversulfated galactosaminoglycans. *Carbohydrate Research* **276**: 401-408.

- Baumann M., Frye T., Naqvi T. et Gómez-Cambronero J. (2005). Normal neutrophil maturation is associated with selective loss of MAP kinase activation by G-CSF. *Leukemia Research* **29**: 73-78.
- Beara I.N., Očić D.Z., Lesjaka M.M., Mimica-Dukić N.M., Peković B.A. et Popović M.R. (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of Plantain (*Plantago L.*) species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **52**: 701-706.
- Belaouaj A. (2002). Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes and Infection* **4**: 1259-1264.
- Benedek B., Kopp B. et Melzig M.F. (2007). *Achillea millefolium L.* s.l. - Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? *Journal of Ethnopharmacology* **113**: 312-317.
- Benhammou N., Atik Bekkara F. et Panovska T.K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2**: 022-028.
- Bernstein B.W. et Bamburg J.R. (2010). ADF/Cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology* **20**: 187-195.
- Bidouard J.-P., Duval N., Kapui Z., Herbert J.-M., O'Connor S.E. et Janiak P. (2003). SSR69071, an elastase inhibitor, reduces myocardial infarct size following ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology* **461**: 49-52.
- Bieth J., Spiess B. et Wermuth C.G. (1974). The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochemical Medicine* **11**: 350-357.
- Borjesson D.L., Kobayashi S.D., Whitney A.R., Voyich J.M., Argue C.M. et Deleo F.R. (2005). Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *The Journal of Immunology* **174**: 6364-6372.
- Borregaard N. et Cowland J.B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**: 3503-3521.
- Borregaard N., Sørensen O.E. et Theilgaard-Mönch K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology* **28**: 340-345.
- Bouriche H., Salavei P., Lessig J. et Arnhold J. (2007). Differential effects of flavonols on inactivation of alpha1-antitrypsin induced by hypohalous acids and the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **459**: 137-142.
- Bouriche H., Selloum L., Tigrine C. et Boudoukha C. (2003). Effect of *Cleome Arabica* leaf extract on rat paw oedema and human neutrophil migration. *Pharmaceutical Biology* **40**: 10-15.
- Burelout C., Thibault N., Harbour D., Naccache P.H. et Bourgoin S.G. (2007). The PGE2-induced inhibition of the PLD activation pathway stimulated by fMLP in human neutrophils is mediated by PKA at the PI3-Kgamma level. *Biochemical Pharmacology* **74**: 730-741.
- Canali R., Vignolini F., Nobili F. Et Mengheri E. (2000). Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (cinc) expression by red wine polyphenols in zinc deficiency induced intestinal damage of rat. *Free Radical Biology and Medicine* **28**: 1661-1670.

- Castro-Díez P., Villar-Salvador P., Pérez-Rontomé C., Meastro-Martínez et Montserrat-Martí G. (1998). Leaf morphology, leaf chemical composition and stem xylem characteristics in two *Pistacia* (Anacardiaceae) species along a climatic gradient. *Flora* **193**: 195-202.
- Chirinos R., Rogez D., Pedreschi R. et Larondelle Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* **55**: 217-225.
- Costa D., Marques A.P., Reis R.L., J.L.F.C. Lima et E. Fernandes (2006). Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. *Free Radical Biology and Medicine* **40**: 632-640.
- Dabos K.J., Sfika E., Vlatta L.J. et Giannikopoulos G. (2010). The effect of mastic gum on *Helicobacter pylori*: A randomized pilot study. *Phytomedicine* **17**: 296-299.
- Dang P.M-C., Raad H., Derkawi R.A., Boussetta T., Paclet M.-H., Belambri S-A., Makni-Maalej K., Krowiarski Y., Morel F., Gougerot-Pocidalo M-A. et El-Benna J. (2011). The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochemical Pharmacology* (**In press**.)
- Dedoussis G.V.Z., Kaliora A.C., Psarras S., Chiou A., Mylona A., Papadopoulos N.G. et Andrikopoulos N.K. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis* **174**: 293-303.
- Descamps-Latscha B. et Witko-Sarsat V. (1999). Relation polynucléaires neutrophiles et monocytes-macrophages. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **39**: 241-247.
- DiStasi M.R. et Ley K. (2009). Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends in Immunology* **30**: 547-556.
- Djenane D., Yangüela J., Montañés L., Djerbal M. et Roncalés P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* **22**: 1046-1053.
- Dokai M., Madoiwa S., Yasumoto A., Kashiwakura Y., Ishiwata A., Sakata A., Makino N., Ohmori T., Mimuro J. et Sakata Y. (2011). Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous alpha1-antitrypsin in lipopolysaccharide-primed hematological cells. *Thromb.Res.*
- Duru M.E., Cakir A., Kordali S., Zengin H., Harmandar M., Izumi S. et Hirata T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* **74**: 170-176.
- Falk W., Goodwin R.H.J.R., et Leonard E.J. (1980). A 48-Well microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *Journal of Immunology Methods* **33**: 239-247.
- Faurschau M. et Borregaard N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection* **5**: 1317-1327.
- Firat-Karalar E.N. et Welch M.D. (2011). New mechanisms and functions of actin nucleation. *Current Opinion in Cell Biology* **23**: 4-13.
- Florentinus A.K., Jankowski A., petrenko V., Bowden P. et Marshall J.G. (2011). The Fc receptor-cytoskeleton complex from human neutrophils. *Journal of Proteomics* **75**: 450-468.

- Fujie K., Shinguh Y., Inamura N., Yasumitsu R., Okamoto M. et Okuhara M. (1999). Release of neutrophil elastase and its role in tissue injury in acute inflammation: effect of the elastase inhibitor, FR134043. *European Journal of Pharmacology* **374**: 117-125.
- Gaborski T.R., Clark A., Waugh R.E. et McGrath J.L. (2008). Membrane mobility of β_2 integrins and rolling associated adhesion molecules in resting neutrophils. *Biophysical Journal* **95**: 4934-4947.
- Gamet-Payraastre S., Manenti S., Gratacap M.P., Tulliez J., Chap H., et Payraastre B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase . *General Pharmacology* **32**: 279-286.
- García-Fayos P. et Verdú M. (1998). Soil seed bank, factors controlling germination and establishment of a Mediterranean shrub: *Pistacia lentiscus* L. *Acta Oecologica* **4**: 357-366.
- Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K. 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**: 1120-1130.
- Garwicz D., Lennartsson A., Jacobsen S.E., Gullberg U. et Lindmark A. (2005). Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. *Haematologica* **90**: 38-44.
- Ghalem B.R. et Benhassaini H. (2007). Etude des phytostérols et des acides gras de *Pistachia atlantica*. *Afrique science* **3**: 405-412.
- Góngora L., Giner R.M., Máñez S., Recio M.C., Schinella G. et Ríos J.L. (2002). Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. *Life Sciences* **71**: 3004-2995.
- Goodridge H.S. et Underhill D.M. (2007). Host recognition of fungal pathogens. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* **4**: 247-252.
- Gougerot-Pocidallo M.-A. et halbwegs-Mecarelli L. (2005). L'activation du polynucléaire neutrophile dans la synovite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme* **72**: 303-309.
- Gougerot-Pocidallo M.A., Elbim C., Dang P.M.C. et El Banna J. (2006). Déficiences fonctionnelles primitives des polynucléaires neutrophiles. *La presse médicale* **35**: 871-878.
- Granger D.N. et Kubes P. (1994). The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial adhesion. *Journal of Leukocyte Biology* **55**: 662-675.
- Gu Y., Lee H.-M., Simon S.R. et Golub L.M. (2011). Chemically modified tetracycline-3 (CMT-3): a novel inhibitor of the serine proteinase, elastase. *Pharmacological Research* **64**: 595-601.
- Gullberg U., Bengtsson N., Bülow E., Garwicz D., Lindmark A. et Olsson I. (1999). Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods* **232**: 201-210.
- Guo R.F. et Ward P.A. (2002). Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 303-310.
- Haeggström J.Z., Rinaldo-Matthis A., Wheelock C.E. et Wetterholm A. (2010). Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**: 135-149.

- Hagio T., Nakao S., Matsuoka H., Matsumoto S., Kawabata K. et Ohno H. (2001). Inhibition of neutrophil elastase activity attenuates complement-mediated lung injury in the hamster. *European Journal of Pharmacology* **426**: 131-138.
- Hansen G., Gielen-Haertwig H., Reinemer P., Schomburg D., Harrenga A. et Niefind K. (2011). Unexpected active-site flexibility in the structure of human neutrophil elastase in complex with a new dihydropyrimidone inhibitor. *Journal of Molecular Biology* **409**: 681-691.
- Heinz A., Jung M. C., Jahreis G., Rusciani A., Duca L., Debelle L., A.S. Weiss, Neubert R.H.H. et Schmelzer C.E.H. (2012). The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie* **94**: 192-202.
- Henriksen P.A. et Sallenave J.M. (2008). Human neutrophil elastase: mediator and therapeutic target in atherosclerosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **40**: 1095-1100.
- Hernández V., Recio M.C., Manez S., Giner R.M. et Rios J.L. (2007). Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences* **81**: 480-488.
- Horwitz M., Benson K.F., Duan Z., Li F.-Q. et Person R.E. (2004). Hereditary neutropenia: dogs explain human neutrophil elastase mutations. *TRENDS in Molecular Medicine* **10**: 163-170.
- Horwitz M.S., Duan Z., Korkmaz B., Lee H.H., Mealiffe M.E. et Salipante S.J. (2007). Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia. *Blood* **109**: 1817-1824.
- Hsu S.P., Lu M.C., Tsao L.T., Kuan Y.H., Chen C.C. et Wang J-P. (2004). Mechanisms of the influence of magnolol on eicosanoid metabolism in neutrophils. *Biochemical Pharmacology* **67**: 831-840.
- Huang J., Chen K., Gong W., Zhou Y., Le Y., Bian X. et Wang J.M. (2008). Receptor "hijacking" by malignant glioma cells: A tactic for tumor progression. *Cancer Letters* **267**: 254-261.
- Hussain S. et Davanger S. (2011). The discovery of the soluble *n*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex and the molecular regulation of synaptic vesicle transmitter release: the 2010 Kavli prize in neuroscience. *Neuroscience* **190**: 12-20.
- Hwang M.K., Kang N.J., Heo Y.-S., Lee K.W. et Lee H.J. (2009). Fyn kinase is a direct molecular target of delphinidin for the inhibition of cyclooxygenase-2 expression induced by tumor necrosis factor- α . *Biochemical Pharmacology* **77**: 1213-1222.
- Hwang T-L., Leu Y-L., Kao S-H., Tang M-C. et Chang H-L. (2006). Viscolin, a new chalcone from *Viscum coloratum*, inhibits human neutrophil superoxide anion and elastase release via a cAMP dependent pathway. *Free Radical Biology and Medicine* **41**: 1433-1441.
- 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**: 207-209.
- Janakat S. et Al-Merie H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacology* **83**: 135-138.
- Jin T., Xu X. et Hereld D. (2008). Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* **44**: 1-8.
- Johansson S., Göransson U., Luijendijk T., Baeldund A., Claeson P. et Bohlin L.A. (2002). A neutrophil multitarget functional bioassay to detect antiinflammatory natural products. *Journal of Natural Products* **65**: 32-41.

- Jordano P. (1989). Pre-dispersal biology of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae): cumulative effects on seed removal by birds. *Oikos* **55**: 375-386.
- Ju Z.Y. et Howard L.R. (2003). Effects of solvents and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of agricultural and Food Chemistry* **51**: 5207-5213.
- Källquist L., Rosén H., Nordenfelt J., Janssen H., Persson A.-M., Hansson M. et Olsson I. (2010). Neutrophil elastase and proteinase 3 trafficking routes in myelomonocytic cells. *Experimental Cell Research* **316**: 3182-3196.
- Kamal J.K.A., Benchaar S.A., Takamoto K., Reisler E. et Chance M.R. (2007). Three-dimensional structure of cofilin bound to monomeric actin derived by structural mass spectrometry data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 7910-7915.
- Kawabata K., Hagio T. et Matsuoka S. (2002). The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *European Journal of Pharmacology* **451**: 1-10.
- Kim Y.-J., Uyama H. et Kobayashi S. (2004). Inhibition effects of (+)-catechin-aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**: 256-261.
- Korkmaz B., Moreau T. et Gauthier F. (2008). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* **90**: 227-242.
- Kouadri-Boudjelthia A. et Wallach J.M. (1997). Hydrophobic interactions are involved in the inhibition of human leukocyte elastase by alkyltrimethylammonium salts. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **29**: 353-359.
- Koutsoudaki C., Krsek M. et Rodger A. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 7681-7685.
- Krasik E.F., Caputo K.E., Hammer et Hammer D.A. (2008). Adhesion dynamics simulation of neutrophil arrest with stochastic activation. *Biophysical Journal* **95**: 1716-1728.
- Kumar V. et Sharma A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology* **10**: 1325-1334.
- Lacy P. (2005). The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacology and Therapeutics* **107**: 358-376.
- Lapornik B., Prösek M. et Wondra A.G. (2005). Comparison of extract prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal Food Engineering* **71**: 214-222.
- László L., Doherty F.J., Watson A., Seli T., Landon M., Lowe J. et Mayer R.J. (1991). Immunogold localisation of ubiquitin-protein conjugate in primary (azurophilic) granules of polymorphonuclear neutrophils. *Federation of European Biochemical Societies* **279**: 175-178.
- Lee H.Y. et Bae Y.S. (2008). The anti-infective peptide, innate defense-regulator peptide, stimulates neutrophil chemotaxis via a formyl peptide receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **369**: 573-578.
- Lee W.L., Harrison R.E. et Grinstein S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection* **5**: 1299-1306.

- Li B.Q., Fu T., Gon W.-H., Dunlop N., Kung H.-F., Yan Y., Kang J. et Wang J.M. (2000). The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology* **49**: 295-306.
- Ligeti E. et Mócsai A. (1999). Exocytosis of Neutrophil Granulocytes. *Biochemical Pharmacology* **57**: 1209-1214.
- Lindmark I.M., Karlsson A., Serrander L., Francois P., Lew D., Rasmusson B., Stendahl O. et Nüße O. (2002). Synaptotagmin II could confer Ca²⁺ sensitivity to phagocytosis in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta* **1590**: 159-166.
- Liu Y., Shaw S.K., Ma S., Yang L., Luscinskas F.W. et Parkos C.A. (2004). Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *Journal of Immunology* **172**: 7-13.
- Ljubuncic P., Song H., Cogan U., Azaizeh H. et Bomzon A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology* **100**: 198-204.
- Longo L., Scardino A. et Vasapollo G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latuifolia* L. and *Rubia peregrina* L. . *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **8**: 360-364.
- Lotufo C.M.C., Lopes C., Dubocovich M.L., Farsky S.H.P. et Markus R.P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *European Journal of Pharmacology* **430**: 351-357.
- Lötzer K., Jahn S., Kramer C., Hildner M., Nüsing R., Funk C.D. et Habenicht A.J.R. (2007). 5-Lipoxygenase/cyclooxygenase-2 cross-talk through cysteinyl leukotriene receptor 2 in endothelial cells. *Prostaglandins and other Lipid Mediators* **84**: 108-115.
- Lunn D.P. et Hurley D.J. (2009). The role of leukocyte biology in laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **129**: 158-160.
- Maamri S. (2008). Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions du Sud algérien: dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Université M'hamed Bougara (Boumerdes), Faculté des sciences, Département de biologie. Pour obtenir un diplôme de Magister en Biochimie et Microbiologie appliquées. Soutenu le 15/06/2008: p. 108.
- Maffei-Facino R., Carini M., Aldini G., Bombardelli E., Morazzoni P. et Morelli R. (1994). Free radical scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidins from *Vitis vinifera*. *Drug Research*. **44**: 592-601.
- Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A.L., Chinou I.B. et Mitaku S. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Planta Medica* **6**: 749-751.
- Maio R.C., Cosentino M., Rossetti C., Molteni M., Lecchini S. et Marino F. (2011). Effect of the lipopolysaccharide antagonist Planktothrix sp. FP1 cyanobacterial extract on human polymorphonuclear leukocytes. *International Immunopharmacology* **11**: 194-198.
- Mañes S., Gómez-Moutón C., Lacalle R.A., Jiménez-Baranda S., Mira E., et Martínez-A C. (2005). Mastering time and space: immune cell polarization and chemotaxis. *Seminars in Immunology* **17**: 77-86.
- Martin C., Burdon P.C.E., Bridger G., Gutierrez-Ramos J.-C., Williams T.J. et Rankin S.M. (2003). chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* **19**: 583-593.

- Mashima H. (1996). Physiology. Kinpodo (Tokyo), 5th ed.: 223-226.
- Massenet C., Chenaves S., Cohen-Addad C., Dagher M-C., Brandolin G., Pebay-Peyroula E., et Fieschi F. (2005). Effects of p47^{phox} C Terminus Phosphorylations on Binding Interactions with p40^{phox} and p67^{phox}. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 13752-13761.
- Mehta D. et Malik A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological Reviews* **86**: 279-367.
- Millius A., Dandekar S.N., Houk A.R. et Weiner O.D. (2009). Neutrophils establish rapid and robust WAVE complex polarity in an actin-dependent fashion. *Current Biology* **19**: 253-259.
- Milon G. (2005). Physiology of the mononuclear phagocytic system. *EMC-Hématologie* **2**: 240-258.
- Mollinedo F., Perez-Sala D., Gajate C., Jimenez B., Rodriguez P. et Lacal J.C. (1993). Localisation of rap 1 and rap2 proteins and the gelatinase-containing granules of human neutrophils. *Federation of European Biochemical Societies* **326**: 209-214.
- Montserrat-Martí G. et Pérez-Rontomé C. (2002). Fruit growth dynamics and their effects on the phenological pattern of native *Pistacia* populations in NE Spain. *Flora* **197**: 161-174.
- Moroy G., Bourguet E., Decarme M., Sapi J., Alix A.J.P., Hornebeck W. et Lorimier S. (2011). Inhibition of human leukocyte elastase, plasmin and matrix metalloproteinases by oleic acid and oleoyl-galardin derivative(s). *Biochemical Pharmacology* **81**: 626-635.
- Mumy K.L. et McCormick B. (2009). The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation. *Current Opinion in Pharmacology* **9**: 697-701.
- Murphy R. et DeCoursey T.E. (2006). Charge compensation during the phagocyte respiratory burst. *Biochimica et Biophysica Acta* **1757**: 996-1011.
- Nozawa F., Hirota M., Kabe A., Hibata M., Wamura T., Aga Y. et Gawa M. (2000). Elastase Activity Enhances the Adhesion of Neutrophil and Cancer Cells to Vascular Endothelial Cells. *Journal of Surgical Research* **94**: 153-158 .
- Nuutila J., Jalava-Karvinen P., Hohenthal U., Laitinen I., Kotilainen P., Rajamaki A., Nikoskelainen J. et Lilius E.M. (2009). Comparison of degranulation of easily mobilizable intracellular granules by human phagocytes in healthy subjects and patients with infectious diseases. *Human Immunology* **70**: 813-819.
- Owen C.A., Campbell M.A., Sannes P.L., Boukedes S.S., et Campbell E.J. (1995). Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *Journal of cell Biology* **131**: 775-789.
- Packer L., RIMBACH G. et Virgili F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine* **27**: 704-724.
- Padrines M., Wolf M., Walz A. et Baggiolini M. (1994). Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Letters* **352**: 231-235.
- Palacio S., Milla R. et Montserrat-Martí G. (2005). A phenological hypothesis on the thermophilous distribution of *Pistacia lentiscus* L. *Flora* **200**: 527-534.

- Paraschos S., Magiatis P., Mitakou S., Petraki K., Kalliaropoulos A., Maragkoudakis P., Mentis A., Sgouras D. et Skaltsounis A.L. (2007). *In vitro* and *in vivo* activities of Chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **51**: 551-559
- Pham C.T.N. (2008). Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **40**: 1317-1333.
- Piwowarski J.P., Kiss A.K. et Kozłowska-Wojciechowska M. (2011). Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of Ethnopharmacology* **137**: 937-941.
- Pollard T.D. et Borisy G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**: 453-465.
- Raptis S.Z., Shapiro S.D., Simmons P.M., Cheng A.M., et Pham C.T. (2005). Serine protease cathepsin G regulates adhesion-dependent neutrophil effector functions by modulating integrin clustering. *Immunity* **22**: 679-691.
- Reig-Armiñana J., Calatayud V., Cerveró J., García-Breijo F.J., Ibars A. et Sanz M.J. (2004). Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environmental Pollution* **132**: 321-331.
- 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. *Phytochemistry Analysis* **13**: 79-86.
- Saito H., Minamiya Y., Saito S. et Ogawa J. (2002). Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation. *Journal of Leukocyte Biology* **72**: 829-836.
- Sartor L., Pezzato E., Dell'Aica I., Caniato R., Biggin S. et Garbisa S. (2002). Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and invasion drug design. *Biochemical Pharmacology* **64**: 229-237.
- Sasawatari S., Yoshizaki M., Taya C., Tazawa A., Furuyama-Tanaka K., Yonekawa H., Dohi T., Makrigiannis A.P., Sasazuki T., Inaba K. et Toyama-Sorimachi N. (2010). The Ly49Q receptor plays a crucial role in neutrophil polarization and migration by regulating raft trafficking. *Immunity* **32**: 200-213.
- Sato T., Takahashi S., Mizumoto T., Harao M., Akizuki M., Takasugi M., Fukutomi T. et Yamashita J. (2006). Neutrophil elastase and cancer. *Surgical Oncology* **15**: 217-222.
- Schröder A.K., von der Ohe M., Fleischer D., Rink L. et Uciechowski P. (2005). Differential synthesis of two interleukin-1 receptor antagonist variants and interleukin-8 by peripheral blood neutrophils. *Cytokine* **32**: 246-253.
- Sieńczyk M., Podgórski D., Blażejewska A., Kulbacka J., Saczko J. et Oleksyszyn J. (2011). Phosphonic pseudopeptides as human neutrophil elastase inhibitors-a combinatorial approach. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **19**: 1277-1284.
- Selloum L., Bouriche H., Tigrine C. et Boudoukha C. (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology* **54**: 313-318.

- Selloum L., Reichel S., Müller M., Sebihi L. et Arnhold J. (2001). Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **395**: 49-56.
- Selvatici R., Falzarano S., Mollica A. et Spisani S. (2006). Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology* **534**: 1-11.
- Semerad C.L., Liu F., Gregory A.D., Stumpf K. et Link D.C. (2002). G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* **17**: 412-423.
- Shao D., Segal A.W. et Dekker L.V. (2010). Subcellular localisation of the p40phox component of NADPH oxidase involves direct interactions between the Phox homology domain and F-actin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **42**: 1736-1743.
- Shreder K.R., Cajica J., Du L., Fraser A., Hu Y., Kohno Y., Lin E.C.K., Liu S.J., Okerberg E., Pham L., Wu J. et Kozarich J.W. (2009). Synthesis and optimization of 2-pyridin-3-ylbenzo[d][1,3]oxazin-4-one based inhibitors of human neutrophil elastase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **19**: 4743-4746.
- Siedle B., Cisielski S., Murillo R., Löser B., Castro V., Klaas C.A., Hucke O., Labahn A., Melzig M.F. et Merfort I. (2002). Sesquiterpene Lactones as Inhibitors of Human Neutrophil Elastase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **10**: 2855-2861.
- Siedle B., Gustavsson L., Johansson S., Murillo R., Castro V., Bohlin L. et Merfort I. (2003). The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. *Biochemical Pharmacology* **65**: 897-903.
- Siedle B., Hrenn A. et Merfort I. (2007). Natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta Medica* **73**: 401-420.
- Slinkard K. et Singleton V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* **28**: 45-55.
- Souto F.O., Zarpelon A.C., Staurengo-Ferrari L., Fattori V., Casagrande R., Fonseca M.J., Cunha T.M., Ferreira S.H., Cunha F.Q. et Verri W.A., Jr. (2011). Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB4, and fMLP: inhibition of actin polymerization. *Journal of Natural Products* **74**: 113-118.
- Sun C. et Munn L.L. (2006). Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary expansions: a lattice Boltzmann analysis. *Physica A* **362**: 191-196.
- Sun Z. et Yang P. (2004). Role of imbalance between neutrophil elastase and α 1-antitrypsin in cancer development and progression. *The Lancet Oncology* **5**: 182-90.
- Surh Y.-J., Chun K.-S., Cha H.-H., Han S.S., Keum Y.-S., Park K.-K. et Lee S.S. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research* **480**: 243-268.
- Tabart J., Kevers C., Sipel A., Pincemail J., Defraigne J.O. et Dommes J. (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chemistry* **105**: 1268-1275.
- Taniguchi K., Yang P. et Jett J. (2002). Polymorphisms in the promoter region of the neutrophil elastase gene are associated with lung cancer development. *Clinical Cancer Research* **8**: 1115-1120.

- Theilgaard-Mönch K., Porse B. et Borregaard N. (2006). Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Current Opinion in Immunology* **18**: 54-60.
- Topçu G., Ay M., Bilici A., Sarıkrükcü C., Öztürk M. et Ulubelen A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* **103**: 816–822.
- Tözeren A. et Ley K. (1992). How do selectins mediate leukocyte rolling in venules? *Biophysical Journal* **63**: 700-709.
- Tuberoso C.I.G., Rosa A., Bifulco E., Melis M.P., Atzeri A., Pirisi F.M. et Dessì M.A. (2010). Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry* **123**: 1242-1251.
- Ueyama T., Tatsuno T., Kawasaki T., Tsujibe S., Shirai Y., Sumimoto H., Leto T.L. et Saito N. (2007). A Regulated Adaptor Function of p40^{phox}: Distinct p67^{phox} Membrane Targeting by p40^{phox} and by p47^{phox}. *Molecular Biology of the Cell* **18**: 441-454.
- Underhill D.M. et Gantner B. (2004). Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection* **6**: 1368-1373.
- 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**: 169-175.
- Voynow J.A., Fischer B.M. et Zheng S. (2008). Proteases and cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**: 1238-1245.
- Weiner O.D. (2002). Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Current Opinion in Cell Biology* **14**: 196-202.
- Werner E. (2004). GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *Journal of Cell Science* **117**: 143-153.
- Werner J.L., Gessner M.A., Lilly L.M., Nelson M.P., Metz A.E., Horn D., Dunaway C.W., Deshane J., Chaplin D.D., Weaver C.T., Brown G.D. et Steele C. (2011). Neutrophils produce interleukin 17A (IL-17A) in a dectin-1- and IL-23-dependent manner during invasive fungal infection. *Infection and Immunity* **79**: 3966-3977.
- Wiesner O., Litwiller R.D., Hummel A.M., Viss M.A., McDonald C.J., Jennec D.E., Fass D.N. et Specks U. (2005). Differences between human proteinase 3 and neutrophil elastase and their murine homologues are relevant for murine model experiments. *FEBS Letters* **579**: 5305-5312.
- Witko-Sarsat V., Pederzoli-Ribeil M., Hirsch E., Sozzani S. et Cassatella M.A. (2011). Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends in Immunology* **32**: 117-124.
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P. et Halbwachs-Mecarelli L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation* **80**: 617-653.
- Wohner N., Kovács A., Machovich R. et Kolev K. (2011). Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathways. *Thrombosis Research* (**In press**.)
- Xu J., Wang F., Van Keymeulen A., Herzmark P., Straight A., Kelly K., Takuwa Y., Sugimoto N., Mitchison T. et Bourne H.R. (2003). Divergent Signals and Cytoskeletal Assemblies Regulate Self-Organizing Polarity in Neutrophils. *Cell* **114**: 201-214.

- Yoo S.K., Deng Q., Cavnar P.J., Wu Y.I., Hahn K.M., et Huttenlocher A. (2010). Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish. *Developmental Cell* **18**: 226-236.
- Yousfi M., Djeridane A., Bombarda I., Duhem B. et Gaydou E.M. (2009). Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytotherapy Research* **23**: 1237-1242.
- Zen K., Cui L.B., Zhang C.Y., et Liu Y. (2007). Critical role of Mac-1 sialyl lewis x moieties in regulating neutrophil degranulation and transmigration. *Journal of Molecular Biology* **374**: 54-63.
- Zen K., Reaves T.A., Soto I. et Liu Y. (2006). Response to genistein: assaying the activation status and chemotaxis efficacy of isolated neutrophils. *Journal of Immunological Methods* **309**: 86-98.
- Zhu G., Li C. et Gao Z. (2007). Inhibitory effect of flavonoid baicalin on degranulation of human polymorphonuclear leukocytes induced by interleukin-8: Potential role in periodontal diseases. *Journal of Ethnopharmacology* **109**: 325-330.
- Zsila E. (2010). Inhibition of heat- and chemical-induced aggregation of various proteins reveals chaperone-like activity of the acute-phase component and serine protease inhibitor human α 1-antitrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **393**: 242-247.