

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/20

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

AOUADI Nour Elhouda

Thème

**Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de
l'extrait protéique des graines de *Pinus pinea* L. sur
l'inflammation intestinale *-in vivo-***

Soutenu le: 22/09/2020 à 14h00

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

REMINI Hocine

MCB

Univ. de Bouira

Président

CHERGUI Achour

MCB

Univ. de Bouira

Examineur

KADRI Nabil

MCA

Univ. de Bouira

Promoteur

BELKADI Asma

Docteur
vétérinaire

SAIDAL. Alger

Co-promotrice

Année Universitaire : 2019/2020

Avant propos

Ce travail rentre dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie appliquée. Il comporte une synthèse bibliographique et une étude expérimentale.

L'étude expérimentale est divisée en deux parties : l'extraction des protéines des graines de *Pinus pinea* L. et l'évaluation de son pouvoir anti-inflammatoire *in vivo*. Cette dernière partie comporte l'observation clinique des souris, l'observation macroscopique des colons, l'étude histologique et le dosage de la myéloperoxydase. Mais le travail pratique qui a été réalisé dans le laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Bouira et dans le laboratoire de pharmaco-toxicologie de SAIDAL a commencé le 1^{er} Mars 2020 dans une période pré-pandémique et il a été arrêté avec l'apparition des premiers cas de Covid-19 en Algérie. En effet, nous avons pu effectuer l'extraction, l'observation clinique et macroscopique alors que l'étude histologique et le dosage de la myéloperoxydase ont été proposés comme perspectives.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie Allah le tout puissant qui m'a fait ouvrir les portes du savoir et m'a fait sortir de l'ignorance, qui m'a donné la force, la volonté et surtout l'amour de savoir pour poursuivre mes études et effectuer ce travail.

Mes remerciements vont à mes chers parents pour leur soutien moral et matériel durant mes études.

*Au terme de ce modeste travail, j'adresse mes vifs remerciements à mon encadrant **Dr. KADRI** pour son encadrement exceptionnel, pour son partage de savoir, sa patience et sa disponibilité durant la période de la réalisation de ce travail et pendant mon cursus universitaire.*

*J'adresse mes sincères remerciements à ma co-promotrice **Mme. BELKADI** pour son aide, sa patience et son temps précieux qu'elle a consacré pour l'élaboration de ce travail.*

*Mes reconnaissances aussi à toute l'équipe de l'animalerie du laboratoire de pharmaco-toxicologie de SAIDAL, **M. DAHMANE** et **M. BOUDJIDA***

*Je tiens à exprimer mes remerciements à **DR. CHERGUI** et **DR. REIMINI** qui m'ont fait l'honneur de présider le jury et d'examiner ce travail ainsi que pour l'aide que j'ai eu de leur part en qualité d'enseignants.*

*Je tiens à remercier également **Mlle. BENZITOUNE**, doctorante à l'université de Bouira, pour son aide dans l'élaboration de ce travail.*

Mes sincères remerciements et gratitude à tous mes enseignants de mon cursus scolaire et universitaire.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail, comme preuve de respect, de gratitude et de reconnaissance :

A mes chers parents, pour leur affection, sacrifice, encouragement, éducation, conseils, leur soutien moral et matériel et pour tout ce qu'ils font pour moi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis pour mon éducation et mon bien être et aucune dédicace ne saurait exprimer mes profonds sentiments envers eux,

*A mon Cher **papa**, l'homme qui croit en moi plus que moi-même, celui qui m'a pas coupé les ailes mais plutôt il m'a appris comment voler avec. Merci de m'avoir appris que rien n'est impossible avec la sagesse, la volonté et la patience et de m'avoir donné la chance de prouver mes capacités.*

*A ma chère **maman**, la prunelle de ma vie, la femme qui s'inquiète toujours pour moi, qui a été toujours à mes cotés, la reine qui ne cesse jamais à me donner son meilleure, Merci de faire de moi une personne responsable, sage et confiante en soi, je suis très reconnaissante pour vos sacrifices pour me tracer une vie assez riche en bonheur.*

A mes frères et sœur :

*« **Abderrahmane** » et « **Ibtihel** », ma fierté, mes exemples de volonté et de courage.*

*« **Zakaria Nedjm Eddine** », la joie de ma vie.*

*A ma belle-sœur « **Yasmine** » que j'adore.*

*A mes chers neuves « **Anes** » et « **Rayane Iskandar** » qu'Allah les protège
A toute personne qui m'a appris une lettre et a partagé son savoir avec moi.*

Liste des abréviations

AA: Acides aminés

ADN: Acide désoxyribonucléique

ANOVA: Analyse of variance

BSA: Bovine serum albumin

[C]: Concentration

°C: Degré Celsius

CEI: Cellules épithéliales intestinales

DAI: Disease activity index

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

HCl: Acide chlorhydrique

IL: Interleukine

LB: Leucotriène B

MC: Maladie de Crohn

MII: Maladies inflammatoires de l'intestin

MPO: Myéloperoxydase

NaCl: Chlorure de sodium

NF-*k*: Nuclear factor-kappa ou Facteur nucléaire-Kappa

pH: Potentiel hydrogène

RCH: Rectocolite ulcéro-hémorragique

Rpm: Rotations par minute

SEM: Standard error mean

UV: Ultraviolets

TNF: Tumor necrosis factor ou Facteur de nécrose tumorale

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Schéma représentant l'anatomie du colon et la coupe histologique de la paroi colique.	11
2	Schéma représentant les formes de la rectocolite ulcéro-hémorragique	12
3	Schéma résumant le protocole expérimental de l'extraction des protéines des graines de <i>Pinus pinea</i> L.	20
4	Photos prises représentant le protocole de l'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait protéique des graines de <i>P. pinea</i> L.	22
5	Photos prises représentant les étapes de l'étude macroscopique des colons	24
6	Évolution pondérale des lots acide acétique, référence et essais en fonctions des jours	26
7	Évaluation de l'indice de l'activité de la maladie chez les lots acide acétique, référence et essais en fonctions des jours	26
8	Morphologie des côlons après induction de l'inflammation et traitement avec la sulfasalazine pour le lot référence et avec l'extrait protéique des graines de <i>P. pinea</i> L. pour les lots essais	29
9	Scores macroscopiques des différents lots	30
10	Effet de l'extrait protéique des graines de <i>P. pinea</i> L. sur la longueur des colons	30

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Les différences entre les protéines animales et les protéines végétales	04
II	Exemples des activités biologiques de <i>Pinus pinea</i> L.	09
III	Exemples des traitements des maladies inflammatoires de l'intestin	14
IV	Les principales différences entre la RCH et la MC	15
V	Réactifs et appareillages utilisés	17
VI	Les étapes de protocole de l'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait protéique des graines de <i>P. pinea</i> L.	22
VII	Les différents scores cliniques	23

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les protéines végétales

I.1. Définition 03

I.2. Structure 03

I.3. Différences entre les protéines végétales et les protéines animales 04

I.4. Les différents types de protéines végétales 04

I.5. Sources de protéines végétales 04

I.6. Les fractions protéiques des végétaux 05

I.7. Propriétés des protéines végétales 06

I.7.1. Propriétés nutritionnelles 06

I.7.2. Propriétés fonctionnelles 07

I.7.3. Propriétés biologiques 07

II. *Pinus pinea* L.

II.1. Généralités sur l'espèce *Pinus pinea* L..... 08

II.2. Composition chimique des graines de *Pinus pinea* L. 08

II.3. Protéines de réserve de *Pinus pinea* L. 09

II.4. Quelques activités biologiques de *Pinus pinea* L. 09

III. L'inflammation intestinale

III.1. Généralités sur l'inflammation..... 10

III.2. Maladies inflammatoires de l'intestin 10

III.2.1. Anatomie du colon..... 10

III.2.2. Rectocolite ulcéro-hémorragique 11

III.2.2.1. Définition de la rectocolite ulcéro-hémorragique	11
III.2.2.2. Formes de rectocolite ulcéro-hémorragique	11
III.2.3. Maladie de Crohn	12
III.2.4. Signes cliniques des maladies inflammatoires de l'intestin	12
III.2.5. Anatomopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin	12
III.2.6. Mécanisme de la pathogénicité des maladies inflammatoires de l'intestin	13
III.2.7. Traitement des inflammations intestinales.....	14
III.2.8. Différences entre la rectocolite ulcéro-hémorragique et la maladie de Crohn.....	15
III.3. Intervention de stress oxydatif dans l'inflammation intestinale	15

ÉTUDE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels	17
I.1. Matériel végétal.....	17
I.2. Matériel animal	17
I.3. Réactifs et appareillages	17
II. Méthodes	18
II.1. Préparation de l'extrait protéique	18
II.1.1. Dosage des protéines totales	19
II.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire	21
II.2.1. Induction de la pathologie	21
II.2.2. Traitement.....	21
II.2.3. Observation clinique	23
II.2.4. Observation macroscopique	24
II.2.5. Analyse statistique	24

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Dosage des protéines totales.....	25
II. Résultats de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	25
II.1. Observation clinique	25
II.2. Observation macroscopique	29
Conclusion et perspectives.....	34

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

L'inflammation est un moyen physiologique de défense de l'organisme vis-à-vis des différentes agressions. La réaction inflammatoire vise à détruire et éliminer l'agent pathogène **(Ndiaye et al., 2006)**.

Les maladies inflammatoires de l'intestin sont un groupe de troubles inflammatoires du tractus gastro-intestinal qui englobent généralement deux pathologies : la rectocolite ulcéro-hémorragique et la maladie de Crohn **(Roda, 2010)**.

Les traitements conventionnels des maladies inflammatoires de l'intestin englobent particulièrement les amino-salicylates, les corticostéroïdes et les immuno-modulateurs. Cependant, ces médicaments présentent des effets secondaires ce qui n'est souhaitable dans la guérison des maladies **(Mennecier, 2017)**. Pour cela, la médecine s'est orientée vers l'utilisation des sources naturelles bioactives telles que les plantes **(Mohammedi, 2013)**.

Depuis l'antiquité, les plantes ont été utilisées par l'être humain à travers le monde pour se soigner car elles représentent une source intéressante des molécules bioactives. Encore aujourd'hui, pour faire face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques notamment les effets secondaires et la toxicité qu'ils présentent, les connaissances sur les plantes médicinales sont devenues de plus en plus développées **(Mohammedi, 2013)**.

Parmi les plantes médicinales, on trouve *Pinus pinea* L., une plante riche en composés bio actifs. Elle est utilisée dans diverses applications notamment en menuiserie, en confiserie, en pâtisserie et même en médecine pour ses activités biologiques notamment l'activité gastro-protective et l'activité hypo-lipidémiant **(Sbay et Hadjib, 2016)**.

Les protéines végétales sont devenues une alternative aux protéines animales, non seulement dans l'alimentation, mais aussi dans plusieurs domaines. Cela est justifié par leur disponibilité, leur faible coût et surtout par leurs propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et biologiques.

Elles sont largement appliquées en pharmacologie car elles sont moins susceptibles de s'accumuler dans les tissus corporels ou de provoquer des effets secondaires graves **(Li-chan, 2015)**.

Parmi les propriétés biologiques nous citons l'activité antimicrobienne, anti oxydante, anti hypertensive et anti-inflammatoire. A titre d'exemple, en général, les légumineux présentent un effet hypocholestérolémique et les peptides dérivés du soja présentent une activité anti-inflammatoire vis-à-vis de l'inflammation intestinale **(Pihlanto, 2013 ; Young et al., 2011)**.

Afin de remédier aux problèmes liés aux principes actifs synthétiques et afin d'augmenter le pouvoir anti-inflammatoire des molécules pharmaceutiques, cette présente étude a pour but d'évaluer le pouvoir anti-inflammatoire des extraits protéiques des graines de *Pinus pinea* L. sur l'inflammation intestinale induite chez les souris par l'acide acétique.

Pour cela, notre travail englobe deux majeures parties :

- La première partie est consacrée à une étude bibliographique comportant des généralités sur les protéines végétales et sur l'espèce *Pinus pinea* L. ainsi que des connaissances sur les maladies inflammatoires de l'intestin.
- La deuxième partie, quant à elle est divisée en deux volets:

Le premier est consacré à l'exposition des matériels et des méthodes utilisées pour l'extraction des protéines et pour les tests de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire. Le deuxième comporte les résultats obtenus des différents tests ainsi que leur discussion.

Synthèse bibliographique

I. Les protéines végétales

I.1. Définition

Les protéines sont des polypeptides composés d'une succession d'acides aminés (AA) liés entre eux de manière covalente par des liaisons peptidiques. Il s'agit des biopolymères d'acides aminés.

Un acide aminé est une molécule composée d'un atome de carbone comportant deux fonctions ionisables, une fonction amine (-NH) sur un côté (N-terminal), une fonction carboxyle (-COOH) sur l'autre côté (C-terminal) et un radical latéral qui est propre à lui et qui fait la différence entre les 20 acides aminés qui existent. En effet, ces derniers sont classés en : AA apolaires aliphatiques, AA apolaires aromatiques, AA apolaires soufrés et AA polaires non chargés, AA polaires chargés négativement appelés aussi AA acides, AA polaires chargés positivement ou AA basiques (**Kruh, 1978**).

I.2. Structure des protéines

Les protéines peuvent se trouver dans plusieurs niveaux d'organisation :

- Structure primaire : c'est le niveau d'organisation le plus simple, la protéine est représentée par une chaîne linéaire d'acides aminés maintenue par des liaisons peptidiques.
- Structure secondaire : elle correspond au repliement de la chaîne primaire donnant naissance à trois principales formes : les hélices qui sont des repliements hélicoïdaux formés par les liaisons hydrogènes entre les groupements carbonyles (-CO) des résidus et les groupements amides (-NH) des autres résidus, les feuillets qui sont représentés par des brins liés entre eux par des liaisons hydrogènes et les coudes qui sont les zones qui relient deux structures secondaires.
- Structure tertiaire : c'est la structure tridimensionnelle ou spatiale de la protéine qui lui confère sa fonctionnalité. Elle est maintenue par les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques et les liaisons disulfures qui se forment entre les atomes de soufre de deux cystéines des chaînes radicales des acides aminés.
- Structure quaternaire : c'est l'assemblage de plusieurs sous-unités reliées par des liaisons non covalentes. Cette structure caractérise les protéines multimériques (**Ramiandrisoa, 2014**).

Synthèse bibliographique : Les protéines végétales

I.3. Différences entre les protéines végétales et les protéines animales

Les protéines végétales sont devenues de plus en plus une alternative aux protéines animales en raison des différents avantages qu'elles présentent notamment leur faible coût, leur disponibilité, la diversité de leurs sources et leurs différentes propriétés.

Le tableau ci-dessous résume les différences entre les protéines animales et les protéines végétales.

Tableau I : Les différences entre les protéines animales et les protéines végétales (Jeejeebhoy, 2000 ; Mezajoug Kenfack, 2010).

	Protéines animales	Protéines végétales
Richesse en AA indispensables	Riches	Pauvres
Présence ou absence des substances anti nutritives	Absentes	Présentes
Digestibilité	Elevée (90%)	Faible (60%)
Risque de transmission d'agents pathogènes	Oui	Non
Coût	Coûteuses	Non coûteuses
Disponibilité	Moins disponibles	Très disponibles
Risque d'avoir des maladies	Fréquent	Moins fréquent

I.4. Les différents types de protéines végétales

Les protéines végétales peuvent être classées selon la méthode d'extraction en :

- **Concentrats de protéines:**

C'est l'ensemble des protéines extraites dans les conditions où elles sont moins solubles voir non solubles, autrement dit, elles sont extraites en utilisant un solvant dans lequel elles sont insolubles en portant le pH du milieu au pH des protéines afin d'éliminer les composés non protéiques hydrosolubles. La teneur en protéines est estimée à 60%.

- **Isolats de protéines:**

C'est l'ensemble des protéines isolées des autres composés non protéiques en passant par deux étapes: la 1^{ère} consiste à solubiliser les protéines dans un solvant où elles sont très solubles (solvants alcalins dont le NaOH est le plus utilisé) afin d'éliminer les composés insolubles et la 2^{ème} consiste à récupérer sélectivement les protéines solubilisées par précipitation en portant le pH du milieu au pH des protéines et éliminer les composés

Synthèse bibliographique : Les protéines végétales

solubles. Les isolats sont plus concentrés en protéines que les concentrats et la pureté est estimée à 90%.

- Hydrolysats des protéines:

C'est l'ensemble des peptides résultants de l'hydrolyse d'une protéine et présentant des propriétés fonctionnelles et biologiques plus sûres.

L'hydrolyse peut se faire par deux méthodes : une hydrolyse chimique utilisant un acide ou une base et une hydrolyse enzymatique utilisant des protéases telles que la trypsine et la pepsine.

La différence entre l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse chimique c'est que cette dernière ne peut pas être utilisée en cas de production des protéines alimentaires et pharmaceutiques à cause de la perte de certains acides aminés et de la production des molécules toxiques au cours de la réaction, contrairement à l'hydrolyse enzymatique qui ne présente pas ces inconvénients et qui donne des hydrolysats protéiques similaires à la séquence protéique de point de vue de composition en acides aminés. Ainsi, l'hydrolyse enzymatique n'est pas dangereuse ni polluante (**Chabanon, 2005**).

I.5. Sources de protéines végétales

Plusieurs plantes sont considérées comme des sources efficaces pour l'obtention de protéines à diverses applications car elles produisent de grandes quantités de protéines avec des protocoles qui sont faciles et avec des faibles coûts (**Arif et Pauls, 2018**).

Parmi les sources de protéines végétales on trouve : les légumineux tels que le pois, les céréales tels que le maïs et le blé, les oléagineux tels que le soja, le colza et le tourne sol.

I.6. Les fractions protéiques des végétaux

On distingue selon la solubilité des protéines quatre fractions : les albumines, les globulines, les prolamines et les glutélines.

- Les albumines :

Ce sont des protéines solubles dans l'eau et présentent principalement un rôle métabolique (enzymes) ou un rôle de défense (inhibiteurs d'enzymes, protéines antimicrobiennes, etc.) (**Mezajoug Kenfack, 2010 ; Gueguen et al., 2016**).

- Les globulines :

Ce sont des protéines solubles dans les solutions salines. Elles constituent les protéines de réserve et représentent 60 à 90% des protéines surtout chez les graines de dicotylédones : les légumineux et les oléagineux.

- Les prolamines :

Ce sont des protéines solubles dans les solvants hydro-alcooliques et représentent les protéines de réserve majoritaires des céréales. Elles sont riches en glutamine et prolines.

- Les glutélines :

Ce sont des protéines solubles dans les milieux très alcalins et représentent les protéines majeures des céréales (**Gueguen *et al.*, 2016**).

I.7. Propriétés des protéines végétales

I.7.1. Propriétés nutritionnelles

Les protéines végétales ou encore matières protéiques végétales, représentent l'un des ingrédients de l'industrie alimentaire.

La valeur nutritionnelle d'une source protéique est définie par son aptitude à satisfaire les besoins en protéines, autrement dit, son aptitude à fournir à l'organisme son besoin en acides aminés pour sa croissance, sa synthèse et renouvellement des composés protéiques nécessaires tels que les enzymes, cette aptitude dépend de deux paramètres, la biodisponibilité et l'efficacité.

La biodisponibilité signifie la composition équilibrée de la protéine en AA et surtout sa richesse en AA indispensables.

Les protéines végétales sont pauvres en AA indispensables en les comparant avec les protéines animales, par exemple les légumineuses sont déficientes des AA soufrés et les céréales sont déficientes de lysine. Il a été prouvé que la biodisponibilité dépend aussi de la digestibilité de la protéine. Les traitements technologiques appliqués sur les protéines et qui servent à améliorer leur digestion par inactivation des substances anti-nutritives et changement de la configuration de la protéine, augmentent le taux des AA indispensables (**Gueguen *et al.*, 2016**).

L'efficacité des acides aminés absorbés reflète leurs effets biologiques sur la santé. Il a été prouvé que certaines protéines végétales ont un pouvoir diminuant de l'inflammation notamment les protéines riches en arginine et cystéine et que les protéines du soja ont des propriétés hypolipémiantes (**Weghuber *et al.*, 2007 ; Mariotti, 2011**).

I.7.2. Les propriétés fonctionnelles

Elles sont définies par les différentes interactions qui se font entre la protéine et le milieu dans lequel elle se trouve, elles sont prises en considération surtout dans l'industrie alimentaire car elles confèrent à l'aliment ses qualités nutritionnelles et organoleptiques. Parmi les propriétés fonctionnelles on trouve les propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes.

Par exemple, les glutens sont utilisés comme ingrédient de texturation dans la fabrication du pain pour son pouvoir de viscoélasticité, les albumines et globulines du soja sont utilisées dans les produits carnés et les desserts pour ses propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes et les concentrés protéiques des graines de *pinus halpensis* Mill présentent des propriétés moussantes et émulsifiantes (Gueguen *et al.*, 2016 ; Abbou *et al.*, 2019).

I.7.3. Les propriétés biologiques

Les protéines végétales sont apparues comme alternative à la chimiothérapie pour protéger l'organisme contre les maladies.

Il a été démontré que des peptides provenant de tubercules de pomme de terre ont une activité antioxydante et protègent l'ADN contre les dommages induits par les radicaux hydroxyles (Pihlanto, 2013).

Pour les légumineux, une teneur élevée en cystéine et méthionine chez les protéines du soja augmente les niveaux d'antioxydants du corps et ses peptides présentent un effet anti-inflammatoire (Sonawane et Arya, 2018 ; Young *et al.*, 2011).

En ce qui concerne la classe des oléagineux, les protéines de colza riches en cystéine permettent de prévenir l'apparition précoce de la résistance à l'insuline et les protéines d'amande présentent un pouvoir anti-inflammatoire (Pihlanto, 2013 ; Udenigwe *et al.*, 2013).

II. *Pinus pinea* L.

II.1. Généralités sur l'espèce

Le *Pinus Pinea* L., Pin parasol, famille de Pinacées, est une plante méditerranéenne. C'est un arbre qui peut atteindre jusqu'à 25 m de hauteur et qui peut vivre plus de 200 ans si les conditions sont favorables, à savoir le climat chaud, ensoleillé et lumineux, les sols pierreux ou sablonneux (**Charrier, 2004**).

Il s'agit d'un arbre gymnosperme, conifère, port en parasol, à tronc unique, cylindrique et droit, avec un système racinaire en pivot. Ses feuilles peuvent se trouver sous deux formes selon l'âge de l'arbre : les écailles, des feuilles primaires de la plantule d'un an, après quelques mois, les aiguilles non piquantes positionnées sur les rameaux courts viennent remplacer les écailles (**Guittonneau et Huon, 1992 ; Agrimi et Ciancio, 1993**).

Le pin pignon est espèce monoïque, les organes reproducteurs sont regroupés en cônes au lieu de fleurs, d'où l'appellation conifères. Les cônes males sont plus gros, de couleur jaunâtre, ovoïdes et groupés sur un petit rameau, alors que les cônes femelles sont tout petits et de couleur rougeâtre (**Theron, 1964 ; Charrier, 2004**).

La classification de l'espèce *Pinus pinea* L. est représentée comme suit (**Sbay et Hadjib, 2016**) :

- Embranchement : Spermaphytes.
- Sous embranchement : Gymnospermes.
- Classe : Coniféroopsidae.
- Ordre : Coniférales.
- Famille : Pinaceae.
- Genre : *Pinus*.
- Espèce : *Pinus pinea* L.

II.2. Composition chimique des graines de *Pinus pinea* L.

La graine de *P. pinea* L. qui est représentée par l'amande recouverte d'une coque ligneuse est une graine riche en lipides (**Agrimi et Ciancio, 1993**).

D'après **Kadri et al. (2015)** l'étude physicochimique des graines de *P. pinea* L. du Nord Algérie montre qu'elles sont composées de 19,78% des lipides représentés principalement par l'acide oléique, linoléique, palmitique et l'acide stéarique, de 1,16% des sucres, de 14,25% des protéines, de 7,99% des polyphénols totaux et de 2,17% des flavonoïdes avec un taux d'humidité de 8,47%.

Elles présentent aussi une richesse en vitamines telles que la vitamine B1, B2, B3, B9, E et K mais aussi en fer et en potassium (Sbay et Hadjib, 2016).

II.3. Les protéines de réserve de *Pinus pinea* L.

Les protéines de réserve végétales sont considérées parmi les aliments de base de l'être humain, elles fournissent plus de la moitié des protéines totales.

Pour les graines de *P. pinea* L., les globulines représentent la plus grande partie des protéines totales (environ 75%), les albumines représentent 15%, les glutélines 10%, les prolamines sont les moins abondants et ne représentent que 1 à 2% (Nasri, 2007).

II.4. Quelques activités biologiques de *Pinus pinea* L.

L'espèce *Pinus pinea* L. représente une valeur importante dans plusieurs domaines notamment en menuiserie pour la bonne qualité du bois de son arbre, en cuisine et en confiserie pour le goût apprécié de ses amandes (Sbay et Hadjib, 2016).

Elle présente aussi des activités biologiques qui sont résumées dans le tableau ci-dessous

Tableau II: Exemples des activités biologiques de *Pinus pinea* L.

Activités biologiques	La fraction responsable de l'activité	Référence
Effet fongicide	Huiles essentielles	Amri <i>et al.</i> , 2012
Activité antimicrobienne	Huiles essentielles	Fekih <i>et al.</i> , 2019
Activité antioxydante	extrait phénolique	Fekih <i>et al.</i> , 2019
Activité gastro-protective	Huile végétale	Sbay et Hadjib., 2016

III. L'inflammation intestinale

III.1. Généralités sur l'inflammation

L'inflammation est un moyen physiologique de défense de l'organisme vis-à-vis des différentes agressions qui peuvent être exogènes telles que les agressions chimiques (acide, base, etc.), physiques (froid et chaud, irradiations par les rayons, etc.) et biologiques (toxines bactériennes, virus, etc.) ou même les agressions endogènes. Elle se termine par l'élimination de l'agent pathogène causant cette agression (Ndiaye *et al.*, 2006).

La réaction inflammatoire se fait par l'intervention des cellules immunitaires (phagocytes, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles, etc.) et des molécules telles que les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Elle est caractérisée par quatre principaux signes macroscopiques qui s'observent au niveau des tissus affectés : une chaleur, une rougeur, un gonflement et une douleur (Youbare-Ziebrou, 2015).

III.2. Les maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires intestinales (MII) sont un groupe de troubles inflammatoires du tractus gastro-intestinal caractérisés par une réponse immunitaire anormale aux antigènes du contenu intestinal qui conduit à un état inflammatoire persistant (Roda, 2010). Elles englobent plusieurs conditions inflammatoires chroniques, notamment la rectocolite ulcéreuse ou rectocolite ulcéro-hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC) qui peuvent être associées par des manifestations extra-intestinales, en particulier, les manifestations articulaires et oculaires (Chaoui *et al.*, 2005).

III.2.1. Anatomie du colon

Le colon est une partie du tube digestif, nommé aussi le gros intestin, situé dans l'abdomen entre le cæcum et le rectum. Il mesure environ 1,5 m de longueur et 8 cm de diamètre. Ses principaux rôles sont d'excréter les déchets, de maintenir l'équilibre hydrique, de réabsorber l'eau ainsi que d'absorber certaines vitamines telles que la vitamine K (Cassilde, 2016).

Le colon est divisé en quatre principales parties : le colon ascendant ou droit, le colon transverse, le colon descendant ou gauche et le colon sigmoïde.

Histologiquement, de l'intérieur (lumière) vers l'extérieur, la paroi colique et rectale est constituée de quatre couches :

- La muqueuse : comporte un revêtement épithélial, soutenu par un tissu conjonctif appelé la lamina propria, son architecture est caractérisée par la présence des tubes droits appelés

Synthèse bibliographique : L'inflammation intestinale

cryptes. La base des cryptes repose sur une mince couche de tissu musculaire lisse appelée *muscularis mucosae* qui sépare la muqueuse de la sous-muqueuse.

- La sous-muqueuse : constituée de tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et un réseau de nerfs sympathiques.
- La musculuse : ou *muscularis propria*, tunique épaisse constituée de cellules musculaires lisses.
- La séreuse pour le colon ou mésorectum pour le rectum, (Zacharias et Semtchenko, 1982): c'est une mince couche de cellules mésothéliales représentant la bordure externe de cette structure (Geobs, 2003).

La figure ci-dessous représente un schéma de l'anatomie du colon et d'une coupe histologique de sa paroi.

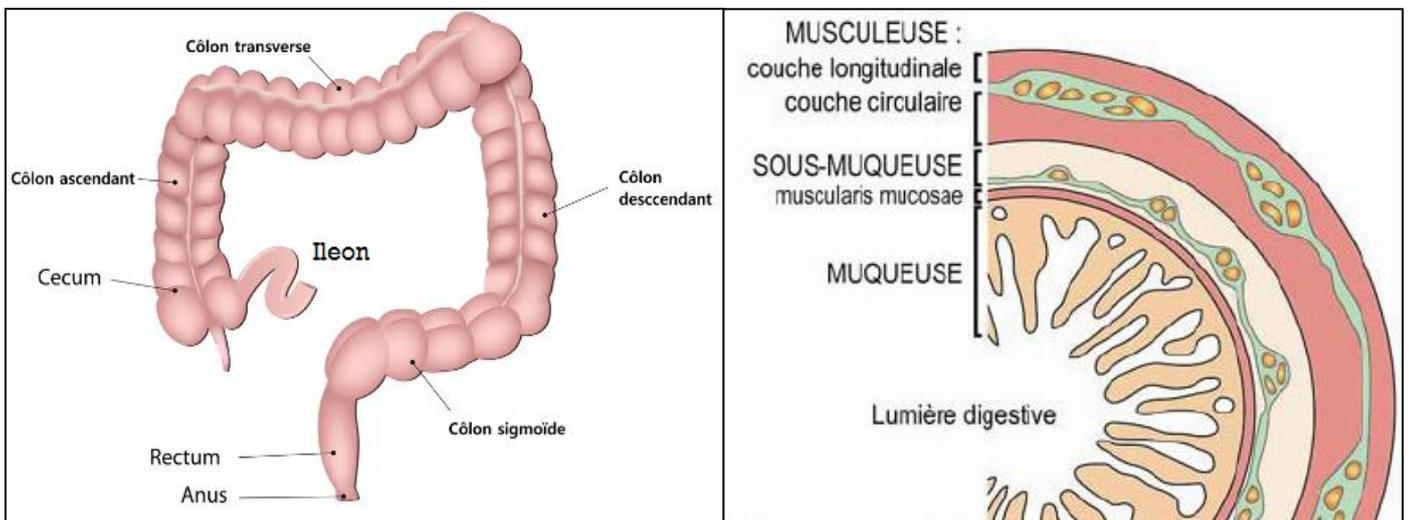


Figure 01 : Schéma représentant l'anatomie du colon et la coupe histologique de la paroi colique (Derkinderen, 2010 ; Giorgerra, 2019).

III.2.2. La rectocolite ulcéro-hémorragique (RCH)

III.2.2.1. Définition de la RCH

La rectocolite ulcéreuse se manifestant par une inflammation et une ulcération qui affectent le colon et le rectum et n'impliquent généralement que la muqueuse ou la muqueuse la plus interne (katheel, 2003).

III.2.2.2. Formes de la RCH

En fonction de l'étendue anatomique de l'atteinte, la colite ulcéreuse peut être présente sous quatre formes:

- La rectite ulcéreuse ou proctite, qui se limite au rectum.
- La proctosigmoïdite, touche le rectum et le colon sigmoïde.
- La colite distale, ou colite du côté gauche, s'étend du rectum jusqu'au côlon descendant.
- La pancolite, touche le colon en entier (**Baumgart et Sandborn, 2007**).

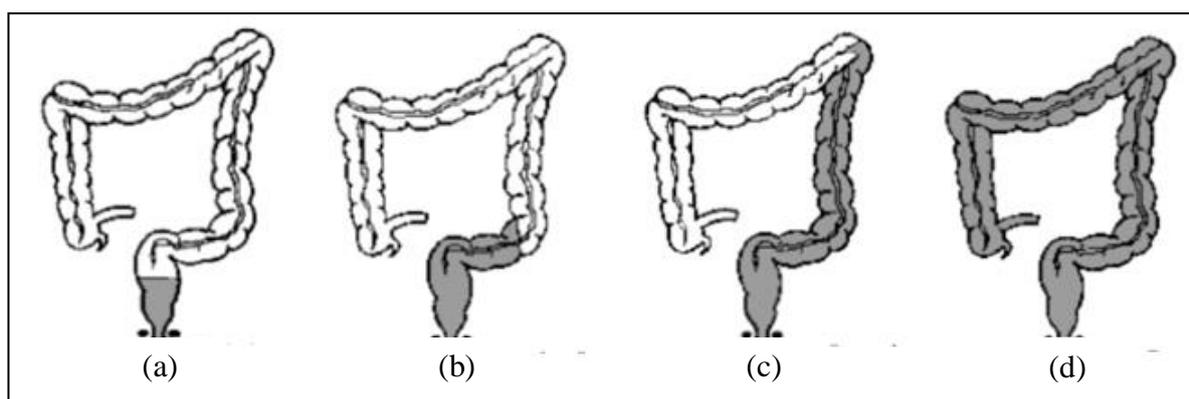


Figure 02 : Schéma représentant les formes de la rectocolite ulcéro-hémorragique. (a): rectite, (b): proctosigmoïdite, (c): colite distale, (d) : pancolite (**Mennecier, 2017**).

III.2.3. Maladie de Crohn (MC)

Contrairement à la RCH, la MC se manifeste par une inflammation transmurale qui affecte n'importe quel endroit du tractus gastro-intestinal, mais les régions les plus affectées sont l'iléon terminal, le colon et l'anus (**Benamer, 2018**).

III.2.4. Les signes cliniques

Les symptômes des MII en stade précoce comprennent un relâchement progressif des selles, des crampes abdominales et de diarrhée. Au fur et à mesure que la maladie passe de légère à plus grave, d'autres symptômes sont observés et qui sont une perte de poids, une fatigue, une perte d'appétit, présence du mucus dans les selles, des saignements rectaux graves et une fièvre (**Katheel, 2003**).

D'autres signes cliniques propres à la maladie de Crohn peuvent apparaître sont des abcès et des fistules anales.

III.2.5. Anatomopathologie

La RCH est une inflammation recto-colique continue, qui commence de la jonction ano-rectale s'étend vers le haut et ne dépasse pas le colon, elle est caractérisée macroscopiquement par une muqueuse rouge et fragile, un saignement muqueux, des érosions et des ulcérations, alors que histologiquement, elle est caractérisée par la présence des distorsions glandulaires et un infiltrat plasmocytaire.

La MC est caractérisée macroscopiquement par un érythème, des ulcérations superficielles ou profondes, des sténoses ulcérées et des fistules. Histologiquement, elle est caractérisée par des distorsions glandulaires, un infiltrat lymphoplasmocytaire et des granulomes épithélioïdes (**Dray et Mrteau, 2007 ; Abergel *et al.*, 2015**).

III.2.6. Mécanisme de pathogénicité

Les cellules épithéliales intestinales (CEI), en plus de leurs fonctions digestives, représentent une barrière physique et chimique entre la lumière intestinale et le milieu interne. Parlant de la barrière physique, il existe des jonctions entre les cellules épithéliales qui rendent la muqueuse impénétrable par les bactéries lumineuses. Alors que chimiquement, la barrière intestinale est représentée par une couche visqueuse de mucus contenant des peptides antimicrobiens qui ont la capacité de lyser les membranes des bactéries pathogènes (**Roda, 2010 ; Kokten, 2016**).

Il est à noter aussi que la muqueuse intestinale contient également des cellules de l'immunité innée, qui sont les cellules dendritiques, les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages, en nombre important pour lutter contre les agressions microbiennes (**Kokten, 2016**).

Étant donné l'importance de l'épithélium dans les mécanismes de régulation de l'immunité intestinale ainsi que la tolérance que présente le système immunitaire vis-à-vis des microorganismes commensaux, il est clair que des défauts à l'un de ces niveaux (les jonctions, la couche de mucus et les cellules immunitaires intestinales) à cause des facteurs environnementaux et génétiques, pourraient être le principal mécanisme pathogène qui provoque la perte de la fonction de la barrière et donc de la tolérance de système immunitaire aux microorganismes luminaux et par conséquent une activation excessive du système immunitaire muqueux, puis l'apparition d'une inflammation chronique contre leurs antigènes, comme cela se produit dans les MII (**Kokten, 2016 ; Roda, 2010**).

Synthèse bibliographique : L'inflammation intestinale

Par exemple, *Escherichia coli* qui est une bactérie commensale retrouvée dans le colon, peut être impliqué dans l'inflammation et les taux d'anticorps anti-*E.coli* se trouvent plus élevés chez les patients atteints des MII que les sujets sains (**Benamer, 2018**).

D'un point de vue mécanistique, cette activation excessive de la réponse immunitaire se traduit par une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires (Interleukine-1 ou IL-1, IL-6, IL-8, facteur de nécrose tumorale (TNF- α)) (**Kokten, 2016**).

D'une autre part, les résultats de l'étude de **Soderholm, 1999** ont montré qu'une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale permet une augmentation de la perméabilité des macromolécules ayant un potentiel antigénique chez l'homme notamment aux protéines alimentaires non dégradées. Cette augmentation de la charge d'antigènes dans la lamina propria pourrait être un déclencheur de l'inflammation des muqueuses et donc un événement pathogène initiateur de la maladie de Crohn.

III.2.7. Traitement de l'inflammation intestinale

Aucun des traitements médicaux des MII qu'on dispose aujourd'hui ne permet la guérison totale, mais ils permettent d'induire une rémission clinique et de stabiliser la maladie. Le traitement comprend plusieurs classes de médicaments à savoir les amino-salicylates, les corticostéroïdes, les antibiotiques, les immuno-modulateurs et les anti-TNF. Le choix du traitement dépend du type de MII, de la sévérité symptomatique et lésionnelle ainsi que de la tolérance de l'organisme vis-à-vis de ce traitement (**lémann, 2007**).

Le tableau ci-dessous résume les différentes classes de traitements des MII avec quelques exemples des médicaments les plus utilisés :

Tableau III : Exemples des traitements des maladies inflammatoires de l'intestin (**Mennecier, 2017**).

Les amino-salicylates	Les immunosuppresseurs	Les antibiotiques	Les corticoïdes	Les anti-TNF
Sulfasalazine, Méسالazine.	Thiopurines (Azathioprine et mercaptopurine), Methotrexate.	Métronidazole, Ciprofloxacine.	Prednisone, Budésonide.	Infliximab, Adalimumab.

Synthèse bibliographique : L'inflammation intestinale

Malgré l'efficacité observée de ces médicaments, sauf qu'à usage prolongé, ils présentent des effets secondaires (pancréatite, néphrite, hépatite, insuffisance rénale, etc.) et compromettent la qualité de vie des patients (Menecier, 2017).

D'autre part, le traitement chirurgical peut être nécessaire pour la grande partie des patients atteints des MII (dans 20% des patients atteints de la RCH et dans 80% des patients atteints de la MC) sauf qu'il est potentiellement curatif dans la RCH puisqu'elle ne touche que le colon et le rectum et pas curatif dans la MC car cette dernière peut récidiver dans un autre segment digestif. Il sert à réséquer l'ensemble de la muqueuse colorectale atteinte.

Dans le cas de la RCH, deux types d'intervention chirurgicale peuvent s'effectuer : une colectomie subtotale avec anastomose iléo-anale et une coloproctectomie avec iléostomie terminale. L'anastomose iléo-rectale peut être appliquée si le rectum n'est pas touché et c'est rarement le cas. Alors que dans la MC, les interventions les plus courantes sont les résections du grêle emportant les segments les plus lésés, la colectomie subtotale avec anastomose iléo-rectale dans le cas de MC avec rectum conservé et anastomose iléo-anale dans le cas d'une atteinte rectale (Maggiori, 2012).

III.2.8. La différence entre MC et RCH

Le tableau ci-dessous représente les différences entre la RCH et la MC.

Tableau IV: Les principales différences entre la RCH et le MC (Yantiss et odze, 2006 ; Dray et Marteau, 2007).

Caractéristiques	Rectocolite ulcéro-hémorragique	Maladie de Crohn
Distribution de la maladie	Diffuse et continue	Segmentaire
Atteinte rectale	Toujours	Occasionnellement
Atteinte iléale	Occasionnellement	Souvent
Localisation de la maladie dans la paroi colique	Superficielle (muqueuse)	Transmurale
Sévérité de la maladie	Augmentant vers l'extrémité distale	Instable et variable
Caractéristiques macroscopiques	Saignement muqueux, érosions, ulcérations superficielles	ulcérations superficielles ou profondes, sténoses ulcérées, fistules, abcès
Caractéristiques histologiques	Distorsions glandulaires, infiltrat plasmocytaire	Fissures profondes, infiltrat lymphoplasmocytaire

Synthèse bibliographique : L'inflammation intestinale

Environ 5% des patients atteints de MII sont inclassables après avoir pris en compte des critères cliniques, radiologiques, endoscopiques et pathologiques, car ils présentent certaines caractéristiques des deux affections. C'est ce que l'on appelle « MII, type non classifié » (Mowat, 2010).

III.3. L'intervention de stress oxydatif dans l'inflammation intestinale

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont des espèces chimiques dérivées de l'oxygène mais plus actives que l'oxygène et qui peuvent être d'origine exogène (exposition environnementale telle que le tabac, l'alcool et les ultraviolets) ou d'origine endogène (en cas d'une inflammation). Elles sont aussi appelées les radicaux libres.

Les ERO sont indispensables à l'organisme car elles participent dans plusieurs processus physiologiques, mais leur présence en taux élevé dépassant le pouvoir antioxydant de l'organisme mène aux dommages sur les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Cette perturbation de la balance: oxydants (ERO)/antioxydants, est qualifiée de stress oxydatif. Ce dernier peut être dû à une sur expression des ERO, à un défaut dans le système antioxydant ou à une insuffisance d'apport nutritionnel antioxydant (Berger, 2006).

Les MII sont caractérisés par un déséquilibre entre la production des ERO et d'antioxydants. Dans le cas d'une inflammation du tissu intestinal, les neutrophiles migrent vers le site enflammé pour défendre contre l'agression par plusieurs mécanismes notamment par la libération des granules qui comprennent l'enzyme myéloperoxydase (MPO). Cette dernière produit des oxydants et exerce une activité antimicrobienne (Serteyn *et al*, 2003 ; Oury *et al*, 2016).

Lorsque la réaction inflammatoire devient incontrôlée, l'infiltration des neutrophiles augmente et donc le taux des oxydants produits par la MPO devient énorme dépassant le pouvoir anti oxydant de l'organisme, ce qui provoque des lésions de l'ADN, une oxydation des protéines et une peroxydation des lipides notamment les acides polyinsaturés de la membrane des cellules épithéliales intestinale, ce qui entraîne sa perturbation et donc une augmentation de la perméabilité intestinale (Oury *et al*, 2016).

Étude Expérimentale

I. Matériels

I.1. Matériel végétal

A. Préparation de la poudre végétale

Les graines de pin pignon ont été récoltées du parc national de Chréa, wilaya de Blida. Elles ont été lavées avec l'eau distillée, séchées à l'aire libre puis broyées à l'aide d'un broyeur mécanique jusqu'à obtention d'une poudre fine.

Une étape de délipidation est nécessaire avant l'extraction des protéines. Pour cela, la poudre a été délipidée à l'aide de soxhlet pendant 6 h en utilisant comme solvant organique l'hexane à (1:10, m/v). La poudre récupérée a été séchée puis tamisée à l'aide d'un tamis de 200 de diamètre de pores.

I.2. Matériel animal

L'étude pratique a été effectuée sur des souris femelles *Swiss albinos*, procurées de laboratoire de recherche et de développement de SAIDAL, Alger. Elles ont été hébergées dans des cages au niveau de l'animalerie avec une température de 22 ± 1 °C, une humidité relative de $55 \pm 10\%$ et de 12 h / 12 h de cycle lumière / obscurité. Les cages sont dotées d'une alimentation standard en granulés et de l'eau *ad libitum*.

I.3. Réactifs et appareillages

Tableau V : Réactifs et appareillages utilisés

Étapes	Réactifs	Appareillage
Extraction	Eau distillée Hexane NaOH (0,1 M) HCl (0,1 M) NaCl (0,5 M)	Broyeur mécanique Balance Soxhlet Tamis pH mètre Centrifugeuse Agitateur Lyophilisateur
Sédation	Acépromazine (10 mg/ml)	Seringue
Évaluation clinique		Balance Thermomètre
Induction	Acide acétique 5%	sonde intra-rectale

Traitement	Eau physiologique 0,9% Sulfasalazine (100 mg/kg) Extraits protéiques (100 ; 200 et 300 mg/Kg)	Sonde de gavage
Dissection		Trousse à dissection (pinces, ciseaux)
Observation macroscopique		Pied à coulisse Balance Loupe

II. Méthodes

II.1. Extraction et préparation de l'extrait protéique

L'extraction des protéines de graines de *Pinus pinea* L. a été effectuée en utilisant la méthode d'extraction alcaline et précipitation au point isoélectrique (**Sumner *et al.*, 1981**).

✓ Principe

La technique d'extraction alcaline et précipitation isoélectrique est basée sur la solubilisation alcaline des protéines, l'élimination de la matière insoluble par centrifugation, la précipitation des protéines à un pH correspondant au point isoélectrique et la collecte des protéines précipitées par centrifugation.

✓ Mode opératoire

Le protocole a été décrit par **Sumner *et al.* (1981)** avec quelques modifications.

a/ Alcalinisation

La poudre délipidée a été mélangée avec l'eau distillée (1:30, m/v) et le pH a été ensuite porté à 9 avec une solution de NaOH à 0,1 M (**Annexe 01**). Le mélange a été laissé sous agitation de 200 rpm pendant environ 76 min. Le tout a été ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min, le surnageant contenant les protéines a été récupéré pour l'acidification alors que le culot a été épuisé pour un meilleur rendement.

b/ Acidification

Le pH de surnageant a été porté au point isoélectrique des protéines avec une solution de HCl 0,1 M sous une agitation de 200 rpm pendant environ 67 min. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min, le surnageant a été éliminé et le culot contenant les protéines a été récupéré, lavé avec de l'eau distillée, neutralisé avec le NaOH 0,1 à pH 7 et les protéines ont été lyophilisées et enfin solubilisées dans une solution saline.

II.2. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**).

✓ Principe

Cette méthode colorimétrique est basée sur le changement de la couleur de bleu de Coomassie qui est manifesté par un changement d'absorbance. Ce changement de couleur est dû à l'interaction du colorant avec les acides aminés basiques et les résidus hydrophobes des acides aminés des protéines présentes dans la solution.

✓ Mode opératoire

Dans un volume de 100 μ l de l'échantillon, un volume de 3 ml du réactif de Bleu Brillant de Coomassie (G 250) préparé à l'avance a été ajouté, le mélange a été mis à l'abri de la lumière pendant 5 min. Ensuite, l'absorbance a été mesurée par spectrophotomètre UV à 595 nm et la concentration protéique des échantillons a été estimée en se référant à la courbe d'étalonnage de la solution du sérum albumin bovin (BSA) (**Annexe 02**). Toutes les étapes sont résumées dans la figure 03.

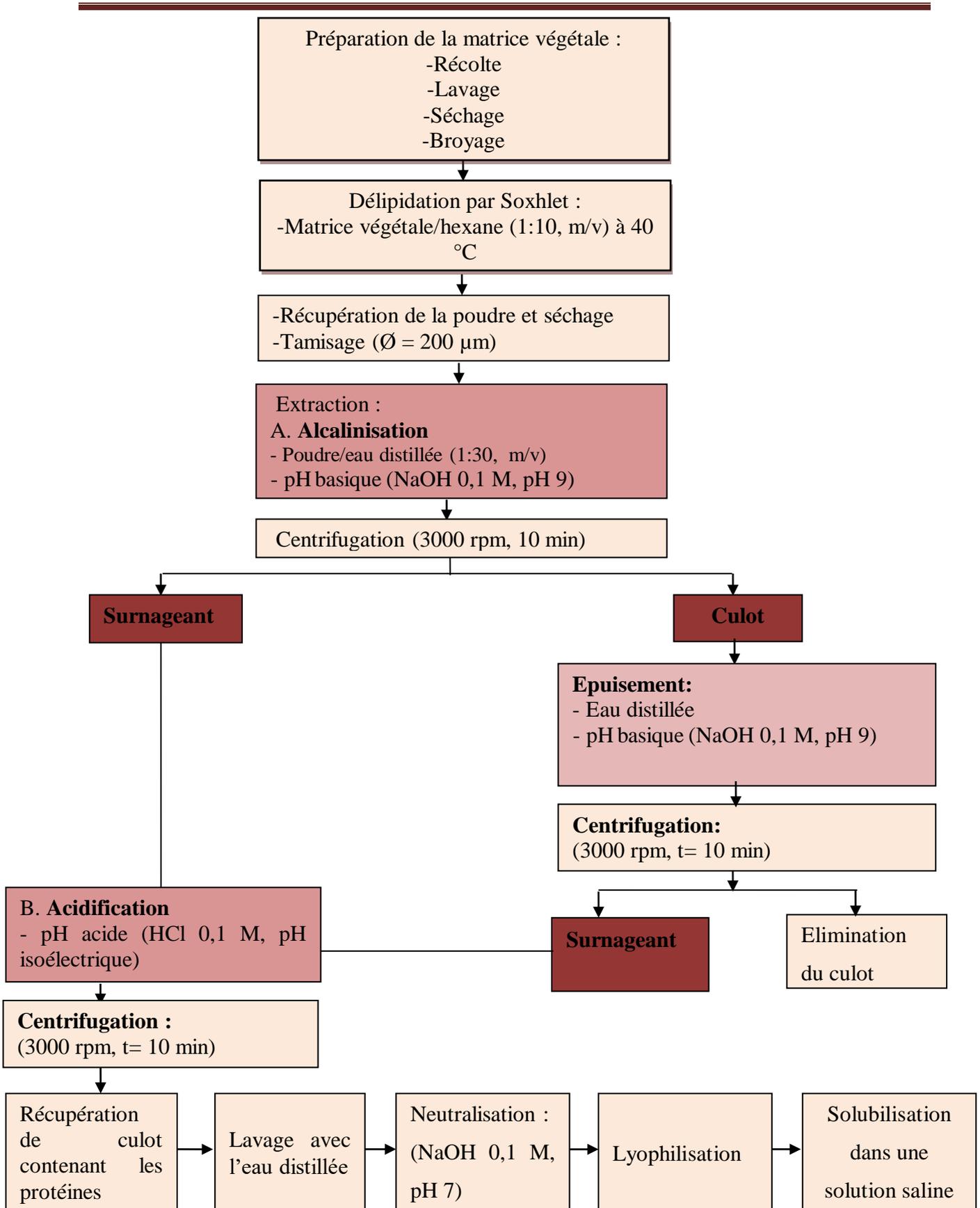


Figure 03 : Schéma résumant le protocole expérimental de l'extraction des protéines des graines de *Pinus pinea* L.

II.2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

✓ **Principe :**

L'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait protéique des graines de *Pinus pinea* L. sur l'inflammation intestinale est basée sur l'induction de l'acide acétique CH₃COOH par voie rectale chez les souris des lots acide acétique, référence et essais puis sur la comparaison des résultats obtenus avec les résultats de sulfasalazine, médicament de référence.

✓ **Mode opératoire :**

• **Organisation des lots :**

La veille de l'expérimentation, six lots ont été construits : lot témoin, lot acide acétique, lot référence et 3 lots d'essais pour 3 différentes concentrations. Chaque lot est composé de 10 souris pesant entre 20 et 40 g et d'âge moyen de 5 semaines qui ont été identifiées et pesées. Le jour même, les solutions utilisées à savoir, Acépromazine (10 mg/ml), l'acide acétique 5%, sulfasalazine (100 mg/Kg) et les extraits protéiques ont été préparées (**Annexe 01**).

II.2.1. Induction de la rectocolite

La rectocolite a été induite selon le protocole décrit par **Randhawa et al. (2014)** avec quelques modifications. En premier lieu, les souris ont été légèrement sédattées par administration de 0,10 ml de l'Acépromazine (10 mg/ml) par voie intra péritonéale.

En deuxième lieu, la colite a été induite par administration de 0,15 ml de l'acide acétique à 5% par voie rectale à l'aide d'une sonde de 2 à 3 cm dans l'anus en position de Trendelenburg, par la suite l'animal a été maintenu en position tête en bas pendant 20 à 30 s pour assurer une distribution uniforme de la solution injectée et éviter son rejet.

II.2.2. Traitement

Après 2 h de l'induction, différents traitements ont été appliqués sur les lots pendant 7 jours une fois par jour pour tester l'activité anti-inflammatoire.

Les étapes de protocole sont représentées dans le tableau ci-dessous

Tableau VI : Les étapes de protocole de l'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait protéique des graines de *P. pinea* L.

Lots	Lot témoin	Lot A. acétique	Lot référence	Lot essai 1	Lot essai 2	Lote essai 3
Étapes						
Sédation	/	0,10 ml de l'Acépromazine par voie intra péritonéale				
Induction	/	0.15 ml de l'acide acétique par voie rectale				
	Après 2h					
Traitement (Administration par gavage)	0,3 ml de l'eau physiologique/ souris	/	0,3 ml de l'anti inflammatoire Sulfasalazine (100 mg/Kg) / souris	0,3 ml de l'extrait de concentration [C] ₁ = 100 mg/Kg / souris	0,3 ml de l'extrait de concentration [C] ₂ = 200 mg/Kg / souris	0,3 ml de l'extrait de concentration [C] ₃ = 300 mg/Kg / souris

Les étapes réalisées, sédation, induction et traitement sont représentées dans la figure ci-dessous.



Figure 04 : Photos prises représentant le protocole de l'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait protéique des graines de *P. pinea* L.

II.2.3. Observation clinique

Enfin, l'observation clinique a été effectuée pendant les 7 jours de traitement, les paramètres qui ont été examinés sont :

- Évaluation pondérale.
- Évaluation thermique.
- Saignements (Epistaxis, rectorragie, hémorragie générale, otorragie, érythème rectale).
- Aspect des selles (Dure, molle, diarrhée aqueuse, diarrhée muqueuse, diarrhée hémorragique et diarrhée muco-hémorragique).
- Douleurs.

Les résultats ont été exprimés selon les scores suivants :

Tableau VII : Les différents scores cliniques

Score de variation du poids	Score de consistance des selles	Score de saignement	Scores de douleur
✓ 0 : Aucune perte	✓ 0 : Selles normales	✓ 0 : Pas de saignement	✓ 0 : Pas d'expression visible
✓ 1 : 1-5 %	✓ 1 et 2 : Selles molles	✓ 1 et 2 : Saignement léger	✓ 1 : Expression caractérisant une douleur modérée
✓ 2 : 5-10 %	✓ 3 et 4 : Diarrhée	✓ 3 et 4 : Saignement important	✓ 2 : Expression caractérisant une douleur sévère
✓ 3 : 10-20 %			
✓ 4 : > 20 %			

En plus de ces scores, l'activité de la maladie a été exprimée par un indice : Disease activity index (DAI) qui est calculé par la somme des 3 scores : score de la variation du poids, score de saignement et score de la consistance des selles.

- ✓ 0-2: Absence de la pathologie.
- ✓ 2-3: Faible installation de la pathologie.
- ✓ 4-5: Installation de la pathologie.

II.2.4. Analyse macroscopique

L'analyse macroscopique consiste à évaluer la gravité de l'ulcération induite par l'acide acétique. Pour cela, le huitième jour, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale puis disséquées, les colons, les foies et les rates ont été récupérés. Les colons ont été coupés soigneusement au niveau de la partie de la jonction iléo-caecale et celle du rectum proximal puis lavés avec l'eau physiologique.

L'observation a été faite à l'aide d'une loupe et le score d'inflammation a été évalué en prenant compte les signes de l'inflammation tels que la présence ou l'absence d'ulcère, d'œdème, d'hyperhémie ou d'autres changements morphologiques. Les critères d'évaluation des dommages macroscopiques ont été exprimés par des scores en utilisant une échelle allant de 0 à 4 comme suit (Morris *et al.*, 1989) :

- ✓ 0: Aucune modification macroscopique.
- ✓ 1: Érythème de la muqueuse uniquement.
- ✓ 2: Léger œdème de la muqueuse, léger saignement ou petites érosions.
- ✓ 3: Œdème modéré, légers ulcères saignants ou érosions.
- ✓ 4: Ulcération grave, œdème et nécrose tissulaire.

Encore, la longueur de chaque colon a été mesurée à l'aide de pied à coulisse digital de la jonction iléo-caecale au rectum proximal et le poids a été pris à l'aide d'une balance.

Ces manipulations sont illustrées dans la figure ci-dessous



Figure 05 : Photos prises représentant les étapes de l'étude macroscopique des colons.

II.2.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Graphe Pad Prism 7.0, software, one Way, par ANOVA, suivi du test de Tukey pour la comparaison statistique. Les résultats des tests ont été exprimés en moyenne \pm SEM et les différences ont été considérées comme significatives (*) à $P < 0,05$.

Résultats et discussion

I. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines extraites des graines de *Pinus pinea* L. a été réalisé par la méthode de Bradford et les résultats obtenus ont montré que le taux des protéines dans l'extrait est de 86,62 g / 100 g de l'extrait protéique. Ce taux de protéines est supérieur à celui trouvé par l'étude de **Abbou *et al.* (2020)** sur les protéines des graines de *Pinus halpensis* Mill. Cette différence peut être due à l'origine de l'espèce à savoir les conditions climatiques ainsi qu'à la méthode d'extraction utilisée.

II. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

La présente étude consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait protéique des graines de *Pinus pinea* L. sur l'inflammation intestinale.

Afin de répondre à cette problématique, l'inflammation a été induite *in vivo* en administrant l'acide acétique CH₃COOH à 5% par voie rectale. Plusieurs agents peuvent être utilisés afin d'induire une ulcération chez un modèle animal mais l'inflammation induite par l'acide acétique présente des similitudes avec celle observée chez l'être humain, pour cela, il a été choisi comme inducteur (**Randhawa *et al.*, 2014**).

Ensuite, quelques paramètres ont été examinés à savoir l'observation clinique et l'analyse macroscopique par la méthode des scores. L'activité anti-inflammatoire de l'extrait a été comparée avec celle de sulfasalazine, médicament de référence.

II.1. Observation clinique

Après injection de l'acide acétique par voie intra rectale, une observation clinique comportant les différents changements physiologiques et comportementaux à savoir le poids de l'animal, la consistance des selles, le saignement ainsi que la douleur, a été faite et les résultats ont été exprimés par des scores cliniques. Encore, l'activité de la pathologie a été exprimée selon le DAI.

Les figures ci-dessous (Figure 6 et 7) illustrent l'évolution du poids avec les signes cliniques observés chez les souris des différents lots (acide acétique, référence et essais) et l'évaluation de l'indice de l'activité de la maladie en fonctions des jours, respectivement.

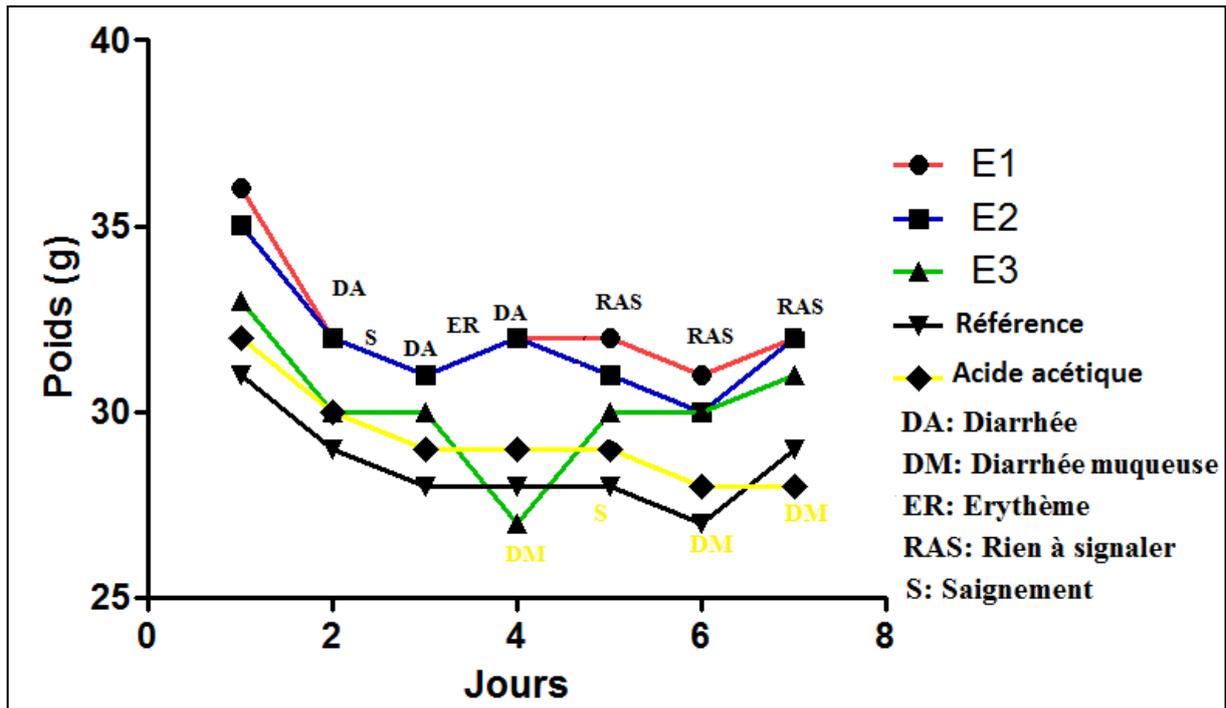


Figure 06 : Évolution pondérale des lots acide acétique, référence et essais en fonctions des jours. (E1: 100 mg/Kg, E2: 200 mg/Kg, E3: 300 mg/Kg)

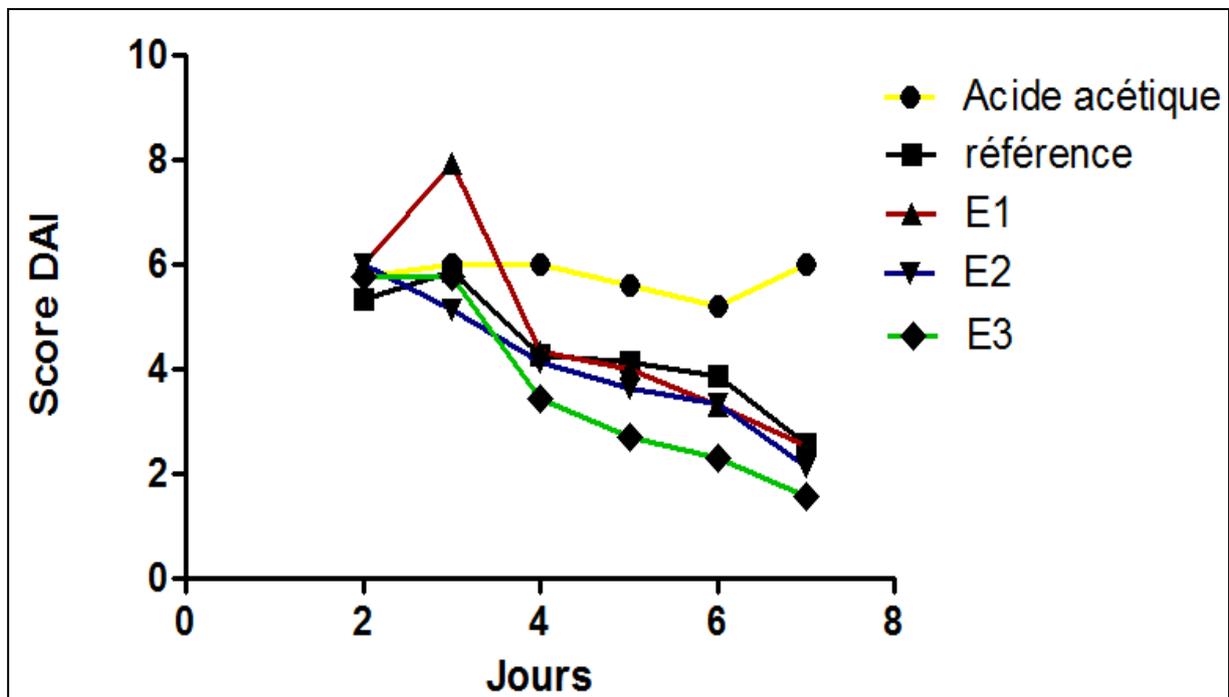


Figure 07 : Évaluation de l'indice de l'activité de la maladie chez les lots acide acétique, référence et essais en fonctions des jours. (E1: 100 mg/Kg, E2: 200 mg/Kg, E3: 300 mg/Kg)

Les résultats obtenus pour chaque lot sont représentés comme suit :

Lot témoin: Aucune modification clinique ou comportementale n'a été observée chez les souris et leur état est resté stable pendant toute la période de l'expérimentation.

Lot acide acétique: Une chute de poids importante a été observée tout au long des jours de traitement avec une moyenne de (29,300 ± 0,522 g) et des scores de variation de perte de poids à des valeurs maximales ont été enregistrés (variation de la perte de poids >20% correspondant à un score de 4). Ainsi, des diarrhées muqueuses et hémorragiques, une rectorragie, un érythème et des douleurs sévères ont été enregistrés sans aucune amélioration enregistrée pendant les jours de traitement.

Selon le DAI, la maladie a été installée le 1^{er} jour après son induction et aucune diminution de son activité n'a été observée pendant les 7 jours de traitement.

La structure de la muqueuse intestinale est maintenue par un équilibre entre la perte apoptotique et la régénération cellulaire. Dans le cas des pathologies intestinales, notamment dans les maladies inflammatoires de l'intestin (MII), sous l'exposition aux cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , la fréquence de l'apoptose épithéliale augmente, ce qui altère la barrière intestinale et donc la capacité du colon à absorber l'eau et les ions diminue, cela induit leur perte dans la lumière intestinale, d'où vient l'apparition des diarrhées (Schulzke *et al.*, 2016).

Lot référence: Une chute de poids a été observée les premiers jours suivie d'une stabilisation entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour avec une moyenne du lot de (28,600 ± 0,481 g). Ainsi, les symptômes indésirables tels qu'une diarrhée, un érythème et des signes cliniques de douleur, ont été observés à partir de 2^{ème} jour, puis, l'état général des souris a été amélioré progressivement pendant les derniers jours, une diarrhée légère a été enregistrée après le 3^{ème} jour.

En observant le DAI, la pathologie a été installée dès le 1^{er} jour, puis son activité a été diminuée à partir de J4.

La disparition des diarrhées en fur et à mesure de l'administration de sulfasalazine est expliquée par son pouvoir de diminuer partiellement le taux de TNF- α (Sakthivel *et al.*, 2013).

Nos résultats obtenus pour les lots acide acétique et référence sont en accord avec les résultats de **Topcu-Tarlacalisir *et al.* (2013)** et **Ghasemi-Pirbaluti *et al.* (2017)**.

Lot essai E1: Une chute de poids a été remarquée le 2^{ème} jour suivie d'une stabilisation, avec une moyenne de $(32,300 \pm 0,644 \text{ g})$ et des faibles scores de variation du poids (Score 2). Ainsi, Une diarrhée, un érythème et des douleurs ont été observés entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour puis à partir de 5^{ème} jour rien n'a été signalé, la consistance des selles est devenue molle puis normale et les souris ont repris leur activité.

Selon le DAI, la pathologie a été installée le 1^{er} jour, puis son activité a été diminuée au bout des 7 jours.

Lot essai E2: Une chute de poids a été observée le 2^{ème} jour suivie d'une stabilisation les autres jours, la moyenne du lot était de $(31,900 \pm 0,595 \text{ g})$. Une diarrhée, un érythème, une rectorragie et des douleurs ont été observés à partir de 2^{ème} jour, puis ils ont été diminués progressivement à partir de 4^{ème} jour jusqu'au rétablissement presque total le 7^{ème} jour.

Selon le DAI, la pathologie a été bien installée le 1^{er} jour, puis elle a diminuée au bout des 7 jours de traitement.

Lot essai E3: Une chute de poids a été remarquée le 2^{ème} jour jusqu'au 4^{ème} jour suivie d'un léger gain entre J5 et J7, la moyenne enregistrée était de $(30,100 \pm 0,670 \text{ g})$. Une diarrhée, un érythème, une rectorragie et des douleurs ont été observés à partir de J2, puis à partir de J5 des selles normales et des selles dures ont été enregistrées et l'état général des souris a été amélioré.

Selon le DAI, la maladie a été installée le 1^{er} jour puis son activité a commencé à diminuer le 4^{ème} jour.

La perte de poids pourrait être due à une réduction de l'appétit (**Ghasemi-Pirbaluti *et al.*, 2017**).

L'analyse statistique de l'évolution pondérale a montré une différence significative entre les lots E1/acide acétique et E2/acide acétique ($P < 0,05$), mais aucune différence entre E3/acide acétique, ni entre référence/acide acétique ($P > 0,05$).

En parallèle, une différence significative a été enregistrée entre les lots E1/référence et E2 référence ($P < 0,05$), contrairement au lot E3 qui n'a présenté aucune différence significative avec le lot référence.

Nous avons remarqué que notre extrait administré a pu atténuer les signes cliniques observés chez les souris et améliorer leur état général par rapport aux souris de lot acide acétique et d'une meilleure façon que le médicament sulfasalazine. Ainsi, l'installation de la maladie a été diminuée en fur et à mesure de l'administration de l'extrait jusqu'au presque une disparition de son activité le 7^{ème} jour.

II.2. Observation macroscopique

L'analyse macroscopique des colons a été réalisée après dissection des souris et les différentes modifications ont été enregistrées et exprimées selon des scores établis par **Morris et al. (1989)** allant de 0 à 4, la longueur des colons a été aussi prise et les résultats obtenus sont représentés dans les figures ci-dessous :

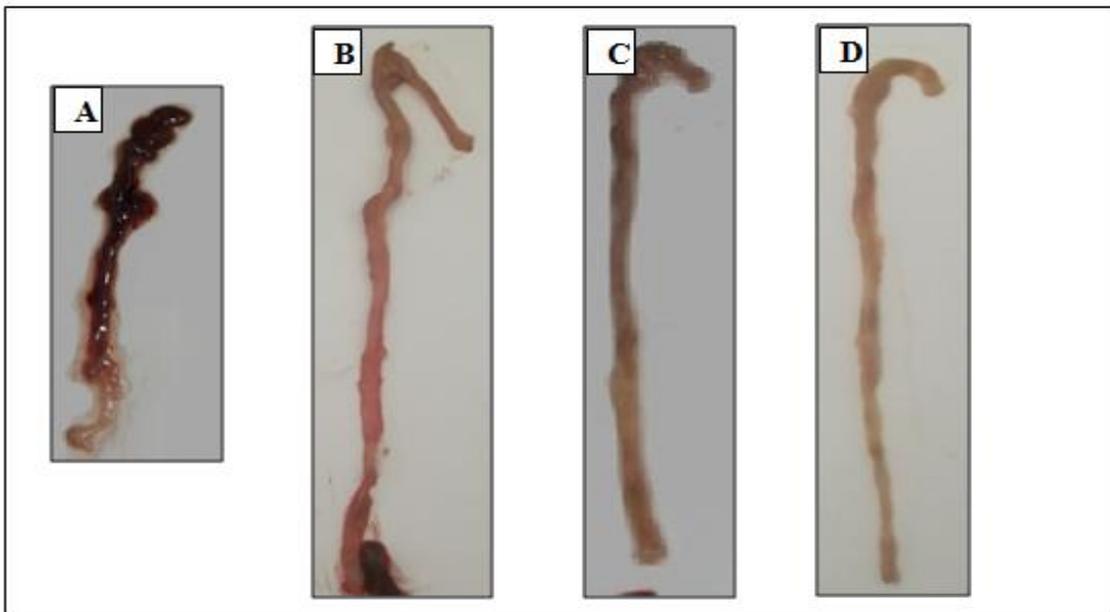


Figure 08: Morphologie des colons après induction de l'inflammation et traitement avec sulfasalazine pour le lot référence et avec l'extrait protéique des graines de *P. pinea* L. pour les lots essais. (A). Groupe ulcéré non traité, (B). Groupe essai traité avec l'extrait (Même morphologie obtenue avec les trois concentrations), (C). Groupe référence traité avec sulfasalazine, (D). Groupe témoin non ulcéré et non traité.

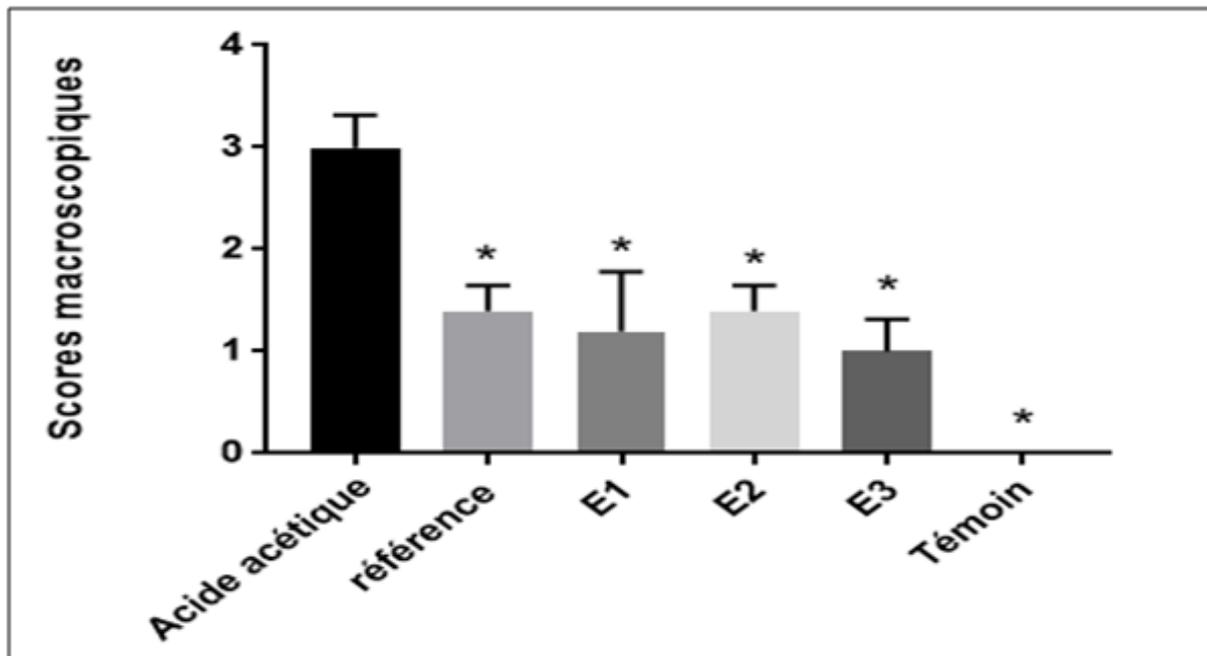


Figure 09 : Scores macroscopiques des différents lots. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. *($P < 0,05$) par rapport au lot acide acétique. (E1: 100 mg/Kg, E2: 200 mg/Kg, E3: 300 mg/Kg)

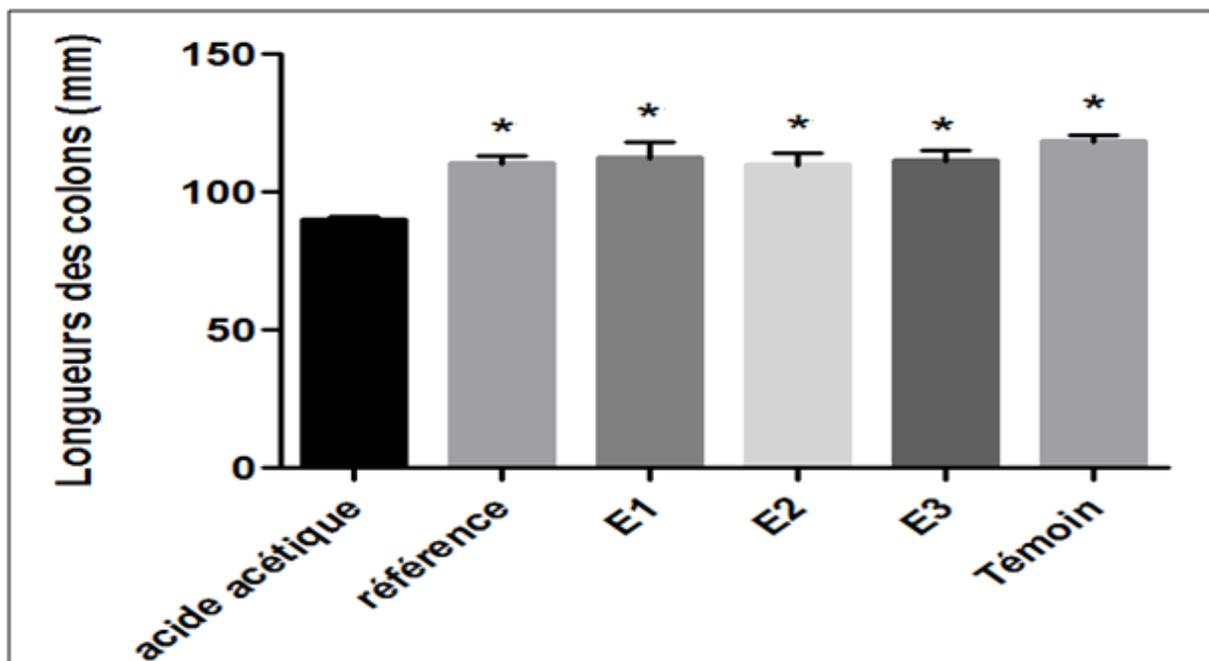


Figure 10 : Effet de l'extrait protéique des graines de *P. pinea* L. sur la longueur des colons. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. *($P < 0,05$) par rapport au lot acide acétique. (E1: 100 mg/Kg, E2: 200 mg/Kg, E3: 300 mg/Kg)

Lot témoin :

Toutes les souris du lot témoin ont présenté des colons sains sans aucun changement morphologique ou phénotypique, en effet, un score macroscopique de $(0,00 \pm 0,00)$ a été enregistré.

Lot acide acétique :

L'analyse macroscopique des colons du lot acide acétique a révélé des dommages graves manifestés par une hyperémie, un œdème, un érythème et des ulcérations indiquant une atteinte grave des colons par l'inflammation, cela a été exprimé par un score élevé de $(3,00 \pm 0,32)$.

Ces résultats trouvés sont en accord avec les études réalisées par **Topcu-Tarladacalisir et al. (2013)** et **Ghasemi-Pirbaluti et al. (2017)** et **Thippeswamy et al. (2011)** qui ont trouvé un score significativement élevé par rapport au lot témoin.

Ainsi, la longueur des colons a subi une réduction significative $(89,73 \pm 1,38 \text{ mm})$ par rapport aux colons des souris témoins ($P < 0,05$).

L'action ulcéreuse de l'acide acétique qui réside dans la perturbation des cellules épithéliales peut être expliquée par la libération de l'acide sous forme protonique ce qui provoque une acidification massive du milieu interne de ces cellules (**Randhawa et al., 2014**).

Ainsi, la rougeur, l'œdème et même l'ulcération sont expliqués par l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le leucotriène B4 (LB 4), un agent chimiotactique issu du métabolisme de l'acide arachidonique, induisant la chimiotaxie des neutrophiles (**Sharon et al., 1985**).

D'une autre part, le rétrécissement de la longueur des colons est dû à l'apoptose cellulaire induite par le TNF- α , alors que l'augmentation de leur poids est justifiée par la présence d'œdème (**Topcu-Tarladacalisi et al., 2013**).

Lot référence :

Des modifications phénotypiques modérées telles qu'une légère ulcération et une hyperémie ont été observées chez les colons du lot référence correspondant à un score de $(1,40 \pm 0,24)$, un score significativement faible par rapport à celui du lot acide acétique ($P < 0,05$).

Ces résultats sont en accord avec les études réalisées par **Sakthivel *et al.* (2013)** qui ont trouvé un score plus faible que celui du lot acide acétique mais élevé par rapport au lot témoin.

Un rétablissement significatif de la longueur des colons a été enregistré aussi ($110,40 \pm 2,80$ mm) en les comparant avec le lot acide acétique ($P < 0,05$).

Ces résultats sont en accord avec les résultats de **Thippeswamy *et al.* (2011)**.

Selon les résultats obtenus, la sulfasalazine a pu diminuer le degré de sévérité de l'ulcération colique. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer son effet anti-inflammatoire, notamment par inhibition de leucotriène B₄ et du facteur nucléaire Kappa (NF- κ).

Il a été démontré que la sulfasalazine agit sur la voie lipoxigénase du métabolisme de l'acide arachidonique en bloquant la 5-Lipoxygénase, l'enzyme clef de la transformation de l'acide arachidonique en leucotriènes, agents pro-inflammatoires tels que le LB 4 (**Sharon *et al.*, 1985**).

Ainsi, la sulfasalazine a un effet inhibiteur de l'activation de NF- κ , le principal facteur de transcription qui intervient dans la signalisation inflammatoire en activant l'expression de divers médiateurs pro-inflammatoires notamment le TNF- α , IL-1 et IL-6 (**Wahl *et al.*, 1998**).

Le rétablissement de la longueur des colons est aussi expliqué par son pouvoir à diminuer le taux de TNF- α (**Wahl *et al.*, 1998 ; Topcu-Tarladacalisi *et al.*, 2013**).

Lots essais :

L'analyse des colons des 3 lots essais E1, E2 et E3 a révélé des modifications légères similaires aux celles du lot référence (Aucune différence significative n'a été enregistrée ($P > 0,05$)) et inférieures au lot acide acétique avec une différence significative ($P < 0,05$) correspondant à des scores de ($1,20 \pm 0,58$), ($1,40 \pm 0,24$) et ($1,0 \pm 0,32$) respectivement.

D'autre part, un rétablissement des longueurs a été enregistré pour les 3 lots ($112,30 \pm 5,82$ mm), ($109,90 \pm 4,37$ mm) et ($110,90 \pm 4,11$ mm) correspondant à E1, E2 et E3 respectivement, sans aucune différence significative avec les résultats de l'administration de la sulfasalazine ($P > 0,05$).

En analysant ces résultats, nous constatons que notre extrait a pu diminuer d'une façon considérable les dommages de l'ulcération causée par l'acide acétique administré.

Nous pouvons déduire d'après les résultats obtenus de l'observation clinique et macroscopique que l'extrait protéique des graines de *Pinus pinea* L. a un effet anti-inflammatoire vis-à-vis de l'inflammation intestinale, avec un résultat semblable à celui du médicament sulfasalazine.

L'effet anti-inflammatoire des extraits protéiques végétaux a été confirmé par des études expérimentales faites *in vivo* et *in vitro*.

D'une part, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de di et tri-peptide des graines de soja dans un modèle porcin d'inflammation intestinale induite par le sulfate de dextrane-sodium (DSS) a montré que l'extrait a pu atténuer les signes macroscopiques de l'inflammation et a pu réduire d'une manière significative l'activité de la MPO et l'expression des TNF- α et IL-17 (Young *et al.*, 2011).

D'autre part, d'après l'étude de Udenigwe *et al.* (2013), l'hydrolysate de l'extrait protéique d'amande a réduit *in vitro* l'expression génétique de TNF- α , d'IL-6 et des indicateurs enzymatiques inflammatoires tels que la cyclo-oxygénase.

Le mécanisme par lequel notre extrait exerce son effet anti-inflammatoire n'est pas encore illustré. Sur la lumière de ces études et en se basant sur l'étude effectuée par Shimizu *et al.* (2007) dans laquelle les auteurs ont exposé les différents mécanismes de l'activité anti-inflammatoire des peptides alimentaires, plusieurs mécanismes peuvent être suggérés. En effet, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait protéique des graines de *Pinus pinea* L. peut être due à son pouvoir inhibiteur de l'expression génétique de certaines molécules pro-inflammatoires telles que le TNF- α et les interleukines, comme c'est le cas dans les peptides extraits des graines de soja et elle peut être due à son pouvoir de lutter contre le stress oxydant en diminuant l'activité de la MPO.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les traitements pharmacologiques à base des agents chimiques des maladies inflammatoires de l'intestin doivent être écartés à cause de leurs effets secondaires.

Cette étude avait pour but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits protéiques des graines de *Pinus pinea* L. sur l'inflammation intestinale - *in vivo*-

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par plusieurs tests après l'induction de l'inflammation par administration de l'acide acétique chez les souris. Les résultats ont montré que l'extrait a un pouvoir réducteur de l'inflammation colique, cela a été confirmé par une baisse des paramètres inflammatoires examinés: une absence des diarrhées, de saignements et d'érythème, une diminution de l'activité de la maladie, une diminution de douleurs, une absence de sévères ulcérations dans le colon et un rétablissement de leur longueur.

Cet effet anti-inflammatoire ne présente aucune différence significative avec celui de sulfasalazine, médicament de référence.

Malgré les résultats positifs obtenus, ce travail ne présente qu'un début de la recherche de l'utilisation d'un tel extrait en pharmacologie. En effet, des études expérimentales complémentaires seront nécessaires à savoir :

- ✓ L'identification de la composition de l'extrait protéique afin de pouvoir isoler la ou les molécules bioactives responsables de l'activité anti-inflammatoire.
- ✓ Des tests de l'activité des hydrolysats au lieu des protéines brutes.
- ✓ Le dosage de la méyloperoxydase.
- ✓ L'étude histologique des colons.
- ✓ Le refait des mêmes tests avec d'autres concentrations.
- ✓ Comprendre les mécanismes impliqués dans le processus de l'inhibition de l'inflammation.
- ✓ L'étude pharmacologique et toxicologique (indice thérapeutique et dose létale 50 DL₅₀).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ABBOU, A, KADRI, N, CHERGUI, A, *et al.* Optimising functional properties and chemical composition of *Pinus halepensis* Mill. Seeds protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 2020, vol. 200, p. 105416.
- ABERGEL, A, ZOULIM, F, VINEL, J.P, *et al.* Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin chez l'adulte et l'enfant. **In** : *Abrégé d'hépatogastro-entérologie et de chirurgie digestive*. 3^{ème} éd. Elsevier-Masson, 2015, p. 353.
- AGRIMI, M, CIANCIO, O. *Le pin pignon (Pinus pinea L.)*. Roma: Silva Méditerranéa – FAO-, 1993, p. 173.
- AMRI, I, HAMROUNI, L, GARGOURI, S *et al.* Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, 2012, vol. 85, p. 199-207.
- ARIF, M, PAULS, K. Properties of Plant Proteins. *Plant Bioproducts*, 2018, p. 121-142.
- BAUMGART, C, SANDBORN, J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Journal of Gastroenterology* 2, 2007, vol. 396, p. 1641-57.
- BENAMER, M. *Les manifestations articulaires au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : Crohn-RCH*. Alger : Galaxie, 2018, p. 63.
- BERGER, M. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2006, vol. 20, p. 48-53.
- Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, 1976, vol. 72, p. 248-254.
- CASSILDE, C. *Le rôle de l'intestin dans l'équilibre de notre santé*. Thèse de doctorat : Sciences pharmaceutiques. Toulouse: Université de Bordeaux 2, 2016, p. 161.

Références bibliographiques

- CHABANON, G. *Hydrolyses enzymatiques d'isolats protéiques issus de tourteaux de colza : cinétique, modélisation, caractérisation et fonctionnalité des peptides*. Thèse de doctorat : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Lorrain: Université de Lorraine, 2005, p. 219.
- CHAOUI, Z, BERNOUSSI, A, BELMEKKI, M, *et al.* Uvéites et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : à propos de 3 cas. *Journal français d'ophtalmologie*, 2005, vol. 28, p. 854-856.
- CHARRIER, S. *Le Pin parasol, Pinus pinea Linné, 1753, en Vendée*. Le naturaliste vendéen, 2004, p. 43-55
- DERKINDEREN, P. Maladie de Parkinson : le tube digestif, une fenêtre ouverte sur le cerveau! In: *Inserm*. (Publié le 14.10.2010). Disponible sur: <https://presse.inserm.fr/maladie-de-parkinson-le-tube-digestif-une-fenetre-ouverte-sur-le-cerveau/15006/> (Consulté le 28.12.2019).
- DRAY, X, MARTEAU, PH. Maladie de Crohn et rectocolite hémorragique. *La revue du Praticien*, 2007, vol. 57, p. 2305-2311.
- GEBOES, K. Histopathology of Crohn's disease and ulcerative colitis, 2003, vol. 18, p. 255-276.
- GHASEMI-PIRBALUTI, M, MOTAGHI, E, NAJAFI, A, *et al.* The effect of theophylline on acetic acid induced ulcerative colitis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, vol. 90, p. 153-159.
- GIORGERRA, J. Côlon : définition, anatomie, schéma. In: *Journal des femmes Santé*. (Modifié le 26.08. 2019). Disponible sur: <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2557326-colon-definition-anatomie-schema-role-maladies/> (Consulté le 15. 01. 2020).

Références bibliographiques

- GUEGUEN, J, WALRAND, S, BOURGEOIS, O. Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 2016, vol. 51, p. 177-185.
- GUITTONNEAU, G-G, HUON, A. *Connaitre et reconnaître la flore et la végétation méditerranéennes*. Rennes: Ouest France, 1992, p. 331.
- JEEJEEBHOY, N. vegetable proteins: are they nutritionally equivalent to animal protein?. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2000, vol.12, p. 1-2
- KADRI, N, KHETTAL, B, AID, Y *et al.* Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill. *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food Chemistry*, 2015, vol. 188, p. 186.
- KATHLEEN, A, HEAD, ND, JULIE, S. Inflammatory Bowel Disease Part I: Ulcerative Colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options-. *Alternative Medicine*, 2003, vol. 8, p. 247-283.
- KOKTEN, T, HANSMANNEL, F, MELHEM, H. Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). *Hegel*, 2016, vol. 6, p.119-129
- KRUH, J. *Biochimie I. Etudes médicales et biologiques*. Paris : Hermann, éditeurs des sciences et des arts, 1978, 243.
- LEMANN, M. Traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 2007, vol. 191, p. 1125-1141.
- MAGGIORI, L, BRETAGNOL, F, FERRON, M, *et al.* Chirurgie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *EMC Gastro-entérologie*, 2012, vol. 7, p. 13.

Références bibliographiques

- MARIOTTI, F. L'inflammation postprandiale: les données récentes suggèrent un rôle préventif des protéines alimentaires et de leur nature. *John Libbey Eurotext*, 2011, vol. 18, p. 14-20.
- MENNECIER, D. Gros plan sur la rectocolite hémorragique. In: *Hepatoweb*. (Modifié le : 28.10.2017). Disponible sur : <http://hepatoweb.com/Rectocolite-Hemorragique-atteintes.php> (Consulté le 26.03.2020).
- MEZAJOUG KENFACK, LB. *Propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines de tourteaux, de concentrats et d'isolats de ricinodendron heudelotii (bail.) pierre ex pax et de tetracarpidium conophorum (müll. arg)*. Thèse de doctorat : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Lorrain : Université de Lorraine, 2010, p. 170.
- MOHAMMED, Z. *Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région Nord et Sud Ouest de l'Algérie*. Thèse de doctorat : Substances naturelles, Activités Biologiques et Synthèses. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid, 2013, p. 169.
- MORRIS, P, BECK, L, HERRIDGE, S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the colon rat. *Gastroenterology*, 1989, vol. 96, p. 795-803.
- MOWAT, C, ANDREW, C, WINDSOR, A, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gastroenterology*, 2010, vol. 60, p. 571-607.
- NASRI, N, TRIKI, S. Les protéines de réserve du pin pignon (*Pinus pinea* L.). *Plant biology and pathology*, 2007, vol. 330, p. 402-409.
- NDIAYE, M, DIEYE, AM, FAYE, B et al. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*Annona reticulata* (Annonaceae) sur l'œdème igue de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 2006, vol. XIV, p. 179-186.
- NERGIZ, C, DONMEZ, I. Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry*, 2003, vol. 86, p. 365–368.

Références bibliographiques

- OURY, C, WERA, O, LANCELLOTTI, P. The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 2016, vol.5, p. 118.
- PIHLANTO, A, MÄKINEN, S. Antihypertensive properties of plant protein derived peptides. *IntechOpen*, 2013, p. 145-182.
- RAMIANDRISOA, D. *Adsorption de protéines sur des colloïdes et agrégation induite*. Thèse de doctorat : Chimie Physique et Chimie Analytique. Paris : Université pierre et marie curie, 2014, p. 123.
- RANDHAWA, K, SINGH, K JAGGI, A-S. A review on chemical-induced Inflammatory Bowel Disease models in Rodents. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2014, vol. 18, p.279-288.
- RODA, G, SARTINI, A, ZAMBON, E, *et al.* Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, vol. 16, p. 4264-4271.
- SAKTHIVEL, K-M, GURUVAYOORAPPAN, C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- κ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis. *International Immunopharmacology*, 2013, vol. 17, p. 907–916.
- SBAY, H, HADJIB, S. *Le-pin-pignon : une espèce de choix dans le contexte des changements climatiques*. Rabat: Centre de recherche forestière, 2016, p. 74.
- SCHULZKE, JD, BOJARSKI, C, FROMM, M, *et al.* Disrupted Barrier Function through Epithelial Cell Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, vol. 1072, p. 288–299.
- SERTEYN, D, GRULKE, S, FRANCK, T. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 2003, vol. 147, p. 79-93.

Références bibliographiques

- SHARON, P, STENSON, F. Metabolism of Arachidonic Acid in Acetic Acid Colitis in Rats. *Gastroentérolology*, 1985, vol. 88, p. 55-63.
- SODERHOLM, D, HOLMGREN, H, OLAISON, G *et al.* Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease?. *Gastroenterology*, 1999, vol. 117, p. 65–72.
- SONAWANE, K, ARYA, S. Plant Seed Proteins: Chemistry, Technology and Applications. *Food and nutrition journal*. 2018, vol. 6, p. 461-469.
- SUMNER, K, NIELSEN, A, YOUNGS, G. Production and Evaluation of Pea Protein Isolate. *Journal of food science*, 1981, vol. 46, p. 364-372.
- THERON, A. *Botanique*. France: Bordas, 1964, p. 287.
- THIPPESWAMY, S, MAHENDRAN, S, BIRADAR, I, *et al.* Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2011, vol. 654, p. 100–105.
- TOPCU-TARLADACALISIR, Y, AKPOLAT, M, KIZILAY, G, *et al.* Effects of Curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid–induced Colitis: The roles of c-Jun N-Terminal Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Journal of medicinal food*, 2013, vol. 4, p. 296-305.
- UDENIGWE, C, CHOC, YS, JE, JY *et al.* Almond protein hydrolysate fraction modulates the expression of pro-inflammatory cytokines and enzymes in activated macrophages. *Food and Function*, 2013, vol. 4, p. 777-783.
- WAHL, C, LIPTAY, S, ADLER, G, *et al.* Sulfasalazine: a Potent and Specific Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, vol. 101, p. 1163–1174.
- WEGHUBER, D, WIDHALM, K. Effect of 3-monthtreatment of children and adolescents with familial and polygenic hupercholesterolaemia with a soya-substitues diet. *British Journal of Nutrition*, 2008, vol. 99, p. 281-286.

Références bibliographiques

- YANTISS, K, ODZE, D. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology*, 2006, vol. 48, p. 116-132.
- YOUNGBARE-ZIEBROU, M.N, OUEDRAOGO, N, LOMPO, M, *et al.* Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 2015, vol. 14, p 213–219
- YOUNG, D, IBUKI, M, NAKAMORI, T, *et al.* Soy-Derived Di- and Tripeptides alleviate colon and ileum inflammation in pigs with Dextran Sodium Sulfate-induced colitis. *Journal of Nutrition*, 2011, vol. 142, p. 363–368.
- ZACHARIAS, L, SEMTCHENKO, I, BALTROUCHAITIS, K, ELISSEEVA, T. *Atlas d'histologie*. 2^{ème} ed. Alger: Office des publications universitaires, 1982, p. 194

Annexes

Annexe 01: Préparation des solutions

1. Préparation de NaOH 0,1 M

4 g de NaOH ont été dissouts dans 1 L de l'eau distillée.

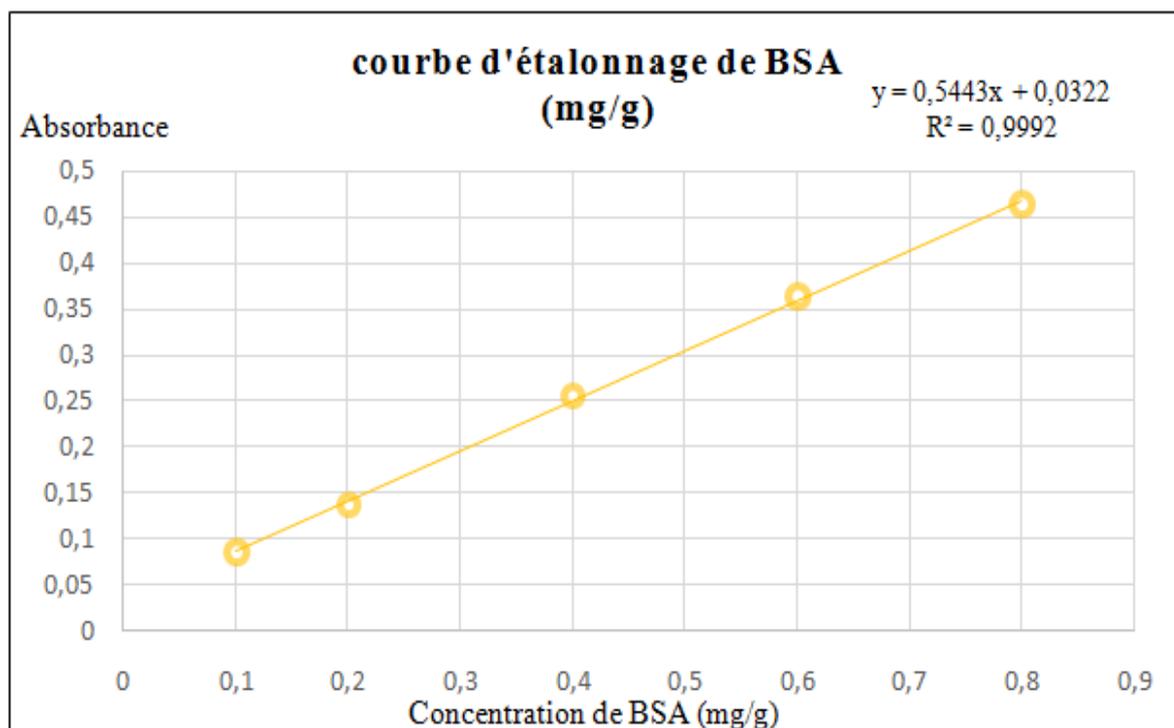
2. Préparation de colorant de Bradford

- 20 mg de colorant G 250 ont été dissouts dans 10 ml d'éthanol à 95%
- 20 ml de l'acide phosphorique à 85% a été ajouté
- Le volume a été ajusté à 100 ml par l'eau distillée.

3. Préparation de la solution de sulfasalazine (100 mg/Kg)

100 mg de sulfasalazine ont été dissouts dans 10 ml de l'eau physiologique

Annexe 02: Courbe d'étalonnage de la solution BSA



Résumé

Pinus pinea L. est une plante médicinale utilisée dans la phytothérapie traditionnelle dont ses graines oléagineuses présentent des activités biologiques intéressantes. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *-in vivo-* de l'extrait protéique de ces graines sur l'inflammation intestinale a fait l'objectif de notre étude. Pour cela, les souris ont reçu l'acide acétique 5% par voie rectale puis traitées avec l'extrait protéique et des paramètres cliniques et macroscopiques ont été évalués. Les résultats de dosage des protéines totales de l'extrait des graines ont montré un taux de (86.62 g/100 g d'extrait). Et les résultats obtenus à l'issue du test anti-inflammatoire ont montré que l'extrait a amélioré les symptômes cliniques de la maladie inflammatoire de l'intestin causée par l'acide acétique, a pu rétablir la longueur des colons et a pu diminuer la gravité de l'ulcération colique. La comparaison des résultats obtenus par administration de l'extrait protéique n'a montré aucune différence avec ceux obtenus par administration de sulfasalazine, médicament de référence.

Mots clés: *Pinus pinea* L., activité anti-inflammatoire, inflammation intestinale, Protéines.

ملخص

الصنوبر الثمري نبتة طبية تستعمل في العلاج الطبي التقليدي حيث أن بذورها الزيتية تحتوي على عدة خصائص بيولوجية مهمة. تقييم النشاط المضاد للالتهابات - في الجسم الحي - لمستخلص البروتين من هذه البذور ضد التهاب الأمعاء هو الهدف من دراستنا. لذلك تم حقن حمض الخل 5% في المستقيم عند الفئران ثم عولجت بالمستخلص البروتيني وتمت تقييم بعض الخواص العيادية والمرئية. نتائج معايرة البروتينات الكلية لمستخلص البذور أظهرت مستوى (86.62 غ / 100 غ مستخلص). كما أظهرت النتائج المستخلصة من اختبار النشاط ضد الالتهاب أن المستخلص حسن الأعراض العيادية لمرض الالتهاب القولوني الذي سببه حمض الخل، وأنه تمكن من إصلاح واستعادة طول القولون كما أنه قلل من خطورة الالتهاب القولوني. إن مقارنة النتائج المتحصل عليها بالمستخلص البروتيني لم تظهر أي فرق مع النتائج المتحصل عليها بتناول "سلفاسالازين" دواء مرجعي.

الكلمات المفتاحية: الصنوبر الثمري *Pinus pinea* L. ، النشاط المضاد للالتهاب، إتهاب الأمعاء، بروتينات.

Abstract

Pinus pinea L. is a medicinal plant used in traditional herbal medicine whose oil seeds have interesting biological activities. The evaluation of the anti-inflammatory activity - in vivo- of the protein extract of these seeds on intestinal inflammation was the objective of our study. For this, the mice were given the acid acetic 5% by rectal administration then they were treated with protein extract and clinical and macroscopic parameters were evaluated. The results of the total proteins determination of the seed extract showed a rate of (86.62 g/100 g of extract). And the results obtained from the anti-inflammatory test showed that the extract improved the clinical symptoms of inflammatory bowel disease caused by acetic acid, was able to restore the length of the colon and was able to reduce the severity of colonic ulceration. The comparison of results obtained by administration of the protein extract showed no difference with those obtained by administration of sulfasalazine, the reference drug.

Keywords: *Pinus pinea* L., Anti inflammatory activity, Intestinal inflammation, Proteins.