

MINISTERE 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/2020



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

MOUILID Louiza & MEBARKI Besma

Thème

Étude de quelques activités biologiques in vitro et in vivo des extraits de saponines et de tannins des graines de Pinus pinea L.

Soutenu le : 15/09/2021 à 09h00

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
<i>M. LEKBAL Farouk</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M^{me} REKIK Samia</i>	<i>INGENIEUR</i>	<i>SAIDAL. Alger</i>	<i>Co-promotrice</i>
<i>M. CHERGUI Achour</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>
<i>M^{lle} BENZITOUNE Nour el Imane</i>	<i>DOCTORANT</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Invitée</i>

Année Universitaire : 2020/2021

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 de deux métabolites secondaires des graines de *Pinus pinea* L. (tanin ; saponine) et l'évaluation de son pouvoir anti-inflammatoire in vivo et quelques activités biologiques in vitro. Cette dernière partie comporte l'activité antioxydante et l'activité anti-hémolytique in vitro évalué dans laboratoire de notre faculté des sciences de la nature et de la vie université de Bouira ; l'activité antibactérienne et antifongique au niveau de laboratoire de microbiologie de SAIDAL-Dar El Beida, cordialement pour l'activité anti-inflammatoire in vivo réalisé au niveau de L'laboratoire pharmacotoxicologie au niveau de centre de recherche et de développement-SAIDAL-Alger. Le travail pratique qui a été réalisé dans les différents laboratoires commencé le 1^{er} Avril 2021 dans une période pandémique de Covid-19 en Algérie.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord nous commençons par remercier 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. Nos remerciements vont à nos chers parents pour leur soutien moral et matériel durant mes études.

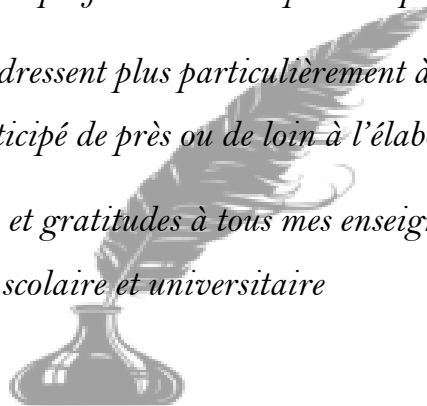
*Au terme de ce modeste travail, nous adressons notre vif remerciement à notre encadrant **Dr. KADRI NABIL** pour son encadrement exceptionnel, pour son partage de savoir, sa patience et sa disponibilité durant la période de la réalisation de ce travail et pendant notre cursus universitaire, ainsi que pour son soutien, ses remarques pertinents et son encouragement.*

*Nos remerciements les plus cordiaux et toutes nos pensées de gratitude à notre Copromotrice **Mlle BENZITOUNE Nour el Imane** qui a codirigé notre projet avec plein de sagesse, de générosité et de gentillesse pendant toute la période du stage. Comme nous sommes très reconnaissantes au chef de département de microbiologie-SAIDAL- **Mme REKIK SAMIA** et l'équipe de l'animalerie pour leurs conseils et leur aide dans la réalisation de la partie in vivo, en particulier **Dr. BELKADI ASMA ET Mr. DAHMANE MOUSSA.***

*Je tiens à exprimer mes remerciements à **DR. CHERGUI Achour** et **DR. LEKBAL Farouk** 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.*

Enfin nos remerciements s'adressent plus particulièrement à nos familles, amis et toutes personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

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



Dédicace



Je dédie ce modeste travail :

À ma mère Houria ; Qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite,

Rien au monde ne vaut les efforts pour mon éducation et bien être et aucune

Dédicace ne saurait exprimer mes profonds sentiments

Que dieu la garde.

A mon père Aissa, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, qui a

Veillé à me donner l'aide, l'encouragement et me protéger, Merci pour les valeurs nobles,

L'éducation et le soutient permanent venu de toi

Que dieu le protège.

A mon cher mari : Mohamed, qui a été une source de force et d'encouragement pour moi.

A mon fils Kossai mon petit ange que dieu le garde et protège

A mes chères sœurs : Malika et Razika.

A mes très chères amies : Fihinane, Ferial, amina, et

Sanaa

A mon binôme : LOUIZA, avec qui j'ai partagé ce modeste travail et qui n'a pas toujours été

Facile ; on a partagé tellement de choses.

A tout qui m'aime.

A tous ceux qui j'aime.



BESMA

Dédicace



*Ma mère **MIMICHA**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père **SAID**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*A mes sœurs : **FATIHA, SAFIA, NAWAL, KARIMA***

Merci de m'avoir soutenu et témoigné votre affection durant tout ce temps. J'ai toujours pu compter sur vous quel que soit le moment. Restons unis et soyons à la hauteur de nos parents. Que DIEU vous bénisse.

*A mon binôme et amie **BESMA** avec qui j'ai partagé tous les moments de stress de fatigue, mais aussi de fous rires.*

Mes professeurs qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.



LOUIZA

Liste des abréviations

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
AINS : anti inflammatoire non stéroïdiens
AIS : anti inflammatoire stéroïdiens
AP-1 : protéine activatrice 1
AS : Acid Salicylique
BHA : Butylated hydroxyanisole
BHT : Butylated hydroxytoluène
COOH : groupe carboxyle
COX : la cyclooxygénase
CRD : Centre de Recherche et de Développement
Da : Dalton
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité optique
ERO : Espèces Oxygène Réactives
FeCl₃ : Chlorure de fer
FRAP: Ferric reducing antioxidant power or Ferric Reducing Ability of Plasma
FPP : farnésyl pyrophosphate
g : gramme
Gram + : Bactérie Gram-positive
Gram - : Bactérie Gram-négative
GRh : globules Rouges Humains
HCl : Acide chlorhydrique
HDL : lipoprotéine à haute densité
HHDP : hexahydroxydiphénique
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
IC₅₀ : Concentration provoquant 50 % d'inhibition
iNOS : nitricoxidesynthase
K₃Fe (CN)₆ : Ferricyanure de potassium
Kg : Kilogramme
K₂S₂O₈ : persulfate de potassium
LDL : lipoprotéine à faible densité



MARK : Mitogen activated protein
m : mètre
Na₂HPO₄ : Phosphate disodique
NaH₂PO₄ : Phosphate de sodium
NaCl : Chlorure de sodium
NF- κ B: Nuclear factor-kappa or Facteur nucléaire-Kappa b
NO : monoxyde d'Azote
OH⁻ : Ion hydroxyle
OMS : Organisation mondiale de la santé
PAF : facteur d'activation plaquettaire
PBS : Phosphate Buffered Salin
pH : Potentiel hydrogène
PI : pourcentage d'inhibition
PLA₂ : phospholipase A₂
PM : Poids Moléculaire
ROS : Réactive Oxygène Specis
RNOS : Reactive nitrogen species
Rpm : Rotations par minute
TCA : Acide Trichloracétique
TCS : Trypto-caséine soja
TCs : Tannin Condensés
THs : Tannin Hydrolysables
TNF : Tumor necrosis factor ou Facteur de nécrose tumorale
TPA : Tetradecanoyl phorbolacetate



Listes des figures

Figure	Titre	Page
1	De haut en bas : pignons noirs ou coques, pignons dans leur pellicule pignons blancs ou amandes comestibles	04
2	Arbre de <i>Pinus pinea L.</i>	05
3	Cônes et graines de <i>Pinus pinea L.</i>	05
4	Aire de répartition naturelle du <i>Pinus pinea L.</i> dans le monde	06
5	Répartition géographique des plantations du pin pignon en Algérie	07
6	Exemple de structure de saponine	11
7	La partie aglycone de saponine (structure de base sapogénine)	12
8	Les principaux squelettes triterpénique	13
9	Squelette de base des génines stéroïdiques (noyau spirostane)	13
10	Les principaux squelettes stéroïdiques	14
11	Les graines entières de <i>Pinus pinea L.</i> avant et après broyage	21
12	Appareillage de soxhlet	21
13	Photographie du lieu d'élevage des souris <i>Swiss albinos</i>	22
14	Schéma récapitulatif des protocoles expérimentaux adoptés	23
15	Protocole d'extraction des saponines des graines de <i>Pinus pinea L.</i>	25
16	Extraction des tannins par le bain à ultrasons	26
17	Protocole d'extraction assistée par ultrason des tannins de <i>Pinus pinea L.</i>	27
18	Les différentes concentrations des extraits testées par la méthode de diffusion en milieu solide	29
19	Schéma récapitulatif des étapes de l'hémolyse induite par des solutions hypotoniques	32



20	Schéma récapitulatif des étapes du test de protection contre d'un stress thermique	33
21	Test FRAP des extraits des graines de <i>P. pinea L.</i>	35
22	Schéma récapitulatif des étapes du l'activité anti-inflammatoire des extrait aqueux de <i>Pinus pinea L.</i>	38
23	Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations de l'extrait de saponine des graines de <i>Pinus pinea L.</i>	46
24	Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations de l'extrait tannique des graines de <i>Pinus pinea L.</i>	47
25	Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations de l'acide salicylique.	47
26	Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis de la lyse induite par un stress thermique en fonction des différentes concentrations d'acide salicylique et des extraits	49
27	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS ⁺ par les extraits de saponines et de tannins des graines de <i>Pinus pinea L.</i>	51
28	Formation du radical cation ABTS ⁺ à partir de l'ABTS	52
29	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS ⁺ de l'acide ascorbique	53
30	Pourcentage d'inhibition du radical ABTS ⁺ du BHT et BHA	53
31	Variation des absorbances du pouvoir réducteur des tannins et saponines à différentes concentrations	55
32	Variation des absorbances du pouvoir réducteur de l'acide ascorbique à différentes concentrations	55
33	Variation des absorbances du pouvoir réducteur du BHA et BHT à différentes concentrations	56
34	Pourcentage de réduction de l'œdème par les extraits des grains de <i>Pinus pinea L.</i> et le Diclofénac 75mg	58



Listes des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Classification taxonomique de <i>Pinus pinea L</i>	06
II	Propriétés physicochimiques et compositions des grains de <i>Pinus pinea L</i>	08
III	Les différentes activités biologiques des saponines	17
IV	Listes des souches microbiennes utilisées	30
V	Les différents traitements appliqués	36
VI	Poids d'extraits secs et rendement correspondant des deux extraits tanins et saponines à partir des graines de <i>Pinus pinea L.</i>	39
VII	Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis-à-vis de l'extrait tannique des graines de <i>Pinus pinea L.</i> à 5, 10, 15 et 30 mg/ml	41
VIII	Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis-à-vis l'extrait de saponine des graines de <i>Pinus pinea L.</i> à 5, 10, 20 et 30 mg/ml	43
IX	Les valeurs des CI ₅₀ (mg/ml) des extraits des graines de <i>Pinus pinea L.</i> et des antioxydants synthétiques	52
X	L'effet des extraits de saponines et tannins des graines complètes de <i>Pinus pinea L.</i> et du Diclofénac sur l'œdème de la patte induit par la carragénine	57



Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 01

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation de Pin pignon (*Pinus pinea* L)..... 03

I.1. Généralité sur le pin pignon..... 03

I.2. Les caractéristiques de Pin pignon..... 03

I.3. Description botanique..... 04

I.4. Taxonomie..... 05

I.5. Distribution géographique..... 06

I.5.1. Aire de répartition géographique de pin pignon dans le monde..... 06

I.5.2. Répartition en Algérie..... 07

I.6. La composition chimique des graines de *Pinus pinea* L..... 07

I.7. Usages multiples et activités biologique 08

II.1. Les saponosides (saponines)..... 10

II.1.1. Généralité 10

II.1.2. Définition 10

II.1.3. Distribution des saponines 10

II.1.4. Classification et structure des saponine..... 11

II.1.5. Mode de liaison (osidic-sapogénine) 15

II.1.6. Les activités biologiques des saponines..... 15

II.2. Les hydroalcooliques (tannins)..... 17

II.2.1. Généralité et définition des tannins..... 17

II.2.2. Localisation et distribution 18

II.2.3. Classification biochimique 18

II.2.4. Les activités biologiques de tannin (propriétés biologiques) 20

ETUDE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel..... 21



I.1. Réactifs et appareillage.....	21
I.2 Matériel végétale	21
I.3. Matériel animal et condition d'élevage	22
I.4. Matériel microbiologique	22
II. Méthodes	24
II.1. Extraction des saponines des graines de <i>P. pinea</i> L.....	24
II.2. Extraction assistée par ultrasons des tannins des graines de <i>P. pinea</i> L.....	26
II.3. Rendement des extraits de tannins et de saponines.....	28
II.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>Pinus pinea</i> L.....	28
II.5. Evaluation de l'activité anti-hémolytique <i>in vitro</i> des extraits	31
II.5.1 Préparation de la suspension érythrocytaire.....	31
II.5.2. Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress osmotique	31
II.5.3. Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress thermique.....	32
II.6. Evaluation des activités antioxydantes des extraits de graine de <i>Pinus pinea</i>	33
II.6.1. Piégeage du radical libre ABTS.....	33
II.6.2. Le pouvoir réducteur de fer (FRAP).....	34
II.7. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits <i>in vivo</i>	35

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Rendement d'extraction.....	39
II. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits	40
II.1. Effet des extraits sur la croissance des souches microbiennes (fongiques et bactériennes)	40
III. Evaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits.....	45
III.1. Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress osmotique.....	45
III.2. Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress thermique.....	49
IV. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits.....	51
IV.1. Test de piégeage du radical ABTS ⁺	51
IV.2. Test de pouvoir réducteur	54
V. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	57
Conclusion et perspectives	60

Références bibliographiques

Annexes



Introduction

INTRODUCTION

Actuellement, le monde a connu un grand développement dans tous les domaines, en particulier le domaine médical et l'industrie pharmaceutique. Néanmoins, Le 21ème siècle s'ouvre et de nombreuses maladies à fort taux de mortalité restent encore sans traitement.

Aujourd'hui, et malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs populations ont recours aux plantes pour se soigner, soit par inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont donné des résultats thérapeutiques très encourageants et à moindre effets secondaires remarqués lors de leur utilisation, soit parce qu'elles sont moins agressives et moins nocives pour l'organisme (**Arrif et al., 2020**). Dans les dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde (**Muthu et al., 2006**).

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80 % des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (**Ghnimi, 2015; Lhuillier, 2007**). Parmi les plantes médicinales, on trouve *Pinus pinea* L, une plante riche en composés bioactifs, elle est utilisée dans divers application notamment en menuiserie, en confiserie, en pâtisserie, dans de nombreux domaines qu'ils soient sanitaires, agroalimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques aussi en médecine pour ses activités biologique (**Hajeb et al., 2016**). La superficie totale couverte par le pin pignon dans le monde est estimée à 600,000 ha ,dont 75% en Espagne, 9% en Portugal, 8% en Turquie, 7% en Italie, 0,5% au Maroc et le reste en Grèce, Liban Tunisie, Algérie et en France (**Bermúdez and Rognon, 1996**).

L'Algérie est considérée parmi les pays les plus connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique subsaharienne (**Laid and Djaballah, 2011**). La flore algérienne dispose d'une grande diversité à laquelle s'ajoute une tradition d'utilisation des plantes. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de cette biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques (**Chaouche et al., 2014**).

Toutefois, Les plantes synthétisent de nombreux composés qui sont classés en fonction de leurs importances dans la viabilité de la plante dont les métabolites primaires qui sont indispensables à leurs existences, une gamme extraordinaire d'autres composés appelés

métabolites secondaires. Les plantes en particulier représentent une immense source des composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes, tannin condensé...). Ces derniers ont pour fonction notamment la protection contre les microorganismes, les animaux et même d'autres plantes. Ces métabolites jouent un rôle primordial dans la lutte contre diverses maladies (Hamoudi et al., 2020).

Dans ce contexte on propose d'étudier la plante médicinale (pin pignon), notre choix s'est porté sur la valorisation et le teste des quelques activités biologiques *Pinus pinea* L. récolté dans la région de charia.

L'objectif de notre travail est donc d'évaluer *in vivo* l'activité anti inflammatoire et quelques activités biologiques *in vitro* (antibactérienne ; anti fongique ; activité antioxydant et anti-hémolytique) des extraits aqueux des graines complète de *Pinus pinea* L. et démontré la richesse de cette plante en principe actif et précisément les deux substances tannins et saponine.

Ainsi, le présent mémoire s'articulera en quatre grandes parties :

- La première partie consacrée à l'étude bibliographique de la plante médicinale (*Pinus pinea* L.) : taxonomie, description botanique, répartition géographique et propriétés thérapeutiques.
- La deuxième partie est un aperçu bibliographique sur les propriétés biologique, classification et la biosynthèse des métabolites secondaires saponines et tannins.
- La troisième partie est la partie expérimentale qui traite :

L'extraction et quantification des deux composés saponines et tannins à partir de la graine complète de *Pinus pinea* L. et l'évaluation de quelques activités biologiques :

- L'activité antioxydant *in vitro* des extraits par les deux méthodes FRAP et ABTS.
 - L'activité antimicrobienne par utilisation de la méthode de diffusion en milieu solide sur quatre souches microbiennes.
 - L'activité anti-inflammatoire *in vivo* par induction de l'inflammation sur différents lots de souris par injection de carragénine à 0,1% suivi d'une injection des extraits de saponine et tannins
- La quatrième partie comporte les résultats obtenus des différents tests ainsi que leur discussion.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives à entreprendre à l'avenir.

Synthèse bibliographique

ελμυερεο ηηηηοξη εβηηδαο

Pinus pinea L.

Pinus pinea L.

I. Présentation de Pin pignon (*Pinus pinea L.*)

I.1. Généralité sur le pin pignon

Le pin pignon (*Pinus pinea L.*) est l'une des essences caractéristiques de la flore méditerranéenne. Il est utilisé depuis l'antiquité en raison de son importance économique liée principalement à la production de pignes et de bois. **(Jaouadi et al., 2021) ; (Calama et al., 2003)**. Il résiste à la sécheresse et au froid, adaptée aux conditions climatiques de la région méditerranéenne, préférant les stations d'altitude et prospère également sur les dunes littorales.

Le pin pignon a été introduit depuis longtemps en Afrique de Nord. En Algérie, les plantations de pin pignon ont été réalisées entre 1935 et 1974. Il existe actuellement de très belles pineraies à pignes datant des années 1970, notamment à Oran (reboisement de Macta), à Chalef (Abou El hassen), à Alger (Bouchaoui), et à Blida (Chrèa) **(Hafsa et al., 2016)**.

Il peut atteindre 15-25 m de haut, les cônes sont de 8 à 15 cm de long sur 7 à 10 cm de large, globuleuses, bruns lustrés, et les graines sont grosses de 1,5 à 2 cm avec une coque dure, les aiguilles elles sont entre 8 à 20 cm de haut, elles sont réunies par 2 ou 3, souples, vrillées, avec bords denticulés **(Kadri et al., 2014)**.

Il s'agit d'une espèce mosaïque, les organes reproducteurs sont regroupés en cônes à la place du fleures, d'où l'appellation conifères. Les cônes males sont plus gros, de couleur jaunâtre, ovoïdes et regroupés sur un petit rameau, alors que les cônes femelles sont tout petits et de couleur rougeâtre **(Beddou, 2015) ; (Charrier et al., 2004)**.

I.2. Les caractéristiques de Pin pignon

Les pignons de pins sont consommés historiquement dans les régions européennes qui en produisent. En Méditerranée, la culture culinaire emploie fréquemment le pignon de pin. Il est l'ingrédient de plusieurs recettes italiennes dont le pesto traditionnel ; en France, il est employé dans les salades, les confiseries et pâtisseries, en liqueurs, on encore en Tunisie pour parfumer le thé. Il existe aussi l'huile de pignon de pin dont les vertus nutritionnelles seraient exceptionnelles **(Beddou, 2015)**.

Ces pignons de pin sont les amandes des graines extraites des cônes de *Pinus pinea L.* ils sont contenus dans des coquilles très dures lignifiées. Lorsqu'ils sont encore à l'intérieur

de cette coquille, ils sont appelés « pignons coques », « graines » ou encore « pignons noirs » en raison de la poudre noire qui les recouvre. Lorsqu'ils sont séparés de leur coquille et que la fine pellicule qui les recouvre est enlevée, ils deviennent comestibles et se nomment les « pignons blancs » ou les « amandes »(Solano, 2016).



Figure 01 : De haut en bas : pignons noirs ou coques, pignons dans leur pellicule pignons blancs ou amandes comestibles.

I.3. Description botanique

Arbre à port typiquement en parasol (Rodrigo et al., 2007), il est sensible aux basses températures, il recherche le soleil et la chaleur, il trouve son optimum sur des terrains sableux et alluviaux (THABEET et al., 2007). Il vit entre 200 à 250 ans, mais certaines auteures ont signalé des exemplaires de plus de 400 ans, les bourgeons sont cylindriques, pointus, avec des écailles réfléchies, d'un brun clair, les arbres monoïques, forment des inflorescences cylindriques. La période de floraison est comprise entre mai et juin (Adili, 2012), et la fructification au cours du troisième automne suivant la floraison (Charrier et al., 2004).

La fructification de Pin pignon commence dès l'âge de 15 à 20 ans, mais la production de graines n'est abondante que tous les 3 ou 4 ans seulement (parfois 5 ou 6). La reproduction commence vers l'âge de 8 à 20 ans selon les peuplements (Nakhoul, 2020). La fécondation a lieu en avril de la seconde année. La maturité du fruit, sa déhiscence et la chute des graines ont lieu en septembre de la troisième année. La production des cônes et de pignes représente le principal intérêt des pinèdes de Pin pignon. La production dépend des facteurs stationnels (Touaba and Alatou, 2018).

➤ **Caractères botaniques**

- **Catégorie** : c'est un conifère monoïque a l'écorce d'un gris brunâtre qui en vieillissant se fissure et se desquame en grandes plaques verticales laissant apparaître une écorce ocre rouge.
- **Feuillage** : persistant (se renouvelle tous les 3 ou 4 ans), vert franc. Longues et épaisses aiguilles (10 à 18 cm) rigides et piquantes réunies en faisceaux par 2 ou 3.
- **Floraison** : au printemps (avril-mai) unisexuée, châtons mâles oblongs ocre jaune assez insignifiants mais fortement chargés de pollen, les femelles en petits cônes aux extrémités des rameaux.
- **Croissance** : lent



Figure 02 : arbre de *Pinus pinea* L.



Figure 03 : cônes et graines de *Pinus pinea* L.

I.4. Taxonomie

Le pin pignon ou pin parasol (*Pinus pinea* L.) appartient à la famille des pinaceae (sous famille des Pinoïdea). Classe des Coniférosideae, Selon **Gaussen (1982)** ; **Ozenda (1991)** Sa position taxonomique est la suivante :

• **Nomenclature**

Pinus pinea Linné, Pinier ou *Pinède*, (**Charrier et al., 2004**) en Français, Pin parasol, Pin Pignon, nommé par les anglophones, Stone pine, ou Umbrella pine (**Fady-Welterlen, 2005**).

- Nom botanique : *Pinus pinea* L.
- Nom français : Pin pignon.
- Nom Arabe : Senouber El-Tamri.

Tableau I : Classification taxonomique de *Pinus pinea L* : (Adili, 2012).

Embranchement	Spermatophytes
S / Embranchement	Gymnospermes
Ordre	Conifirales
S/ Ordre	Pinacées
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinea L</i>

I.5. Distribution géographique

I.5.1. Aire de répartition géographique de pin pignon dans le monde

La pin pignon a été planté dans la région méditerranéenne septentrionale, de la péninsule Ibérique à l'Anatolie jusqu'aux côtes méridionales de la mer Noire où l'espèce est probablement spontanée dans certains secteurs. Les pinèdes les plus étendues, en partie d'origine naturelle, se trouvent dans la péninsule Ibérique avec près de 400 000 ha (Dominguez-Lerena et al., 2006). La superficie totale couverte par le Pin pignon dans le monde est estimée à 600 000 Ha (75 % en Espagne, 9 % au Portugal, 8 % en Turquie, 7 % en Italie, 0,5 % au Maroc et le Reste en Grèce, Liban, Tunisie et en France) (SEIGUE, 1985).

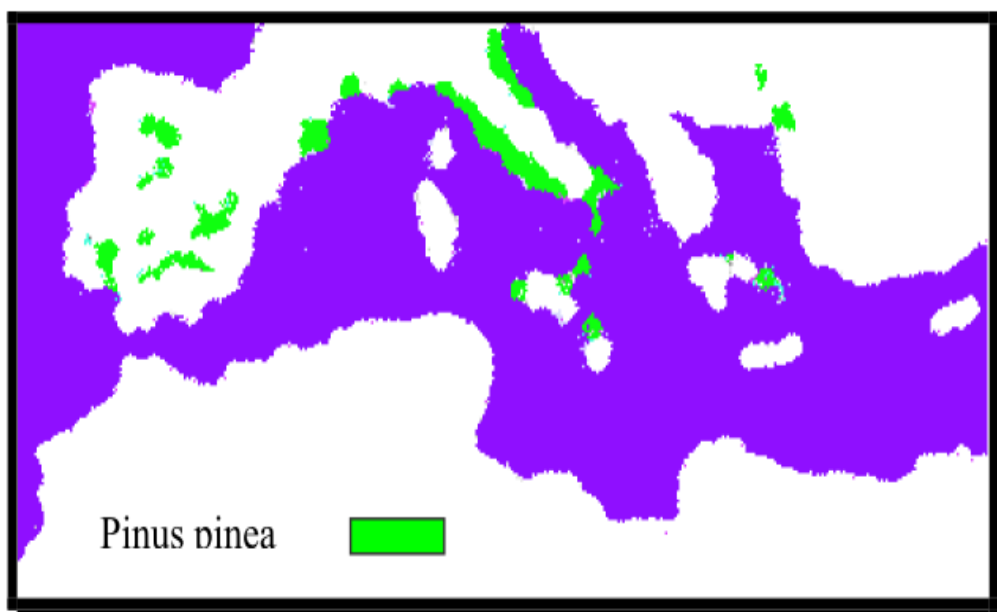


Figure 04 : Aire de répartition naturelle du *Pinus pinea L.* dans le monde (SEIGUE, 1985).

I.5.2. Répartition en Algérie

En Algérie les plantations de Pin pignon ont été réalisées entre 1935 et 1974 couvrant une superficie totale de 3506 ha. Les wilayas concernées sont : Constantine, Bouira, Mostaganem, Médéa et Annaba.

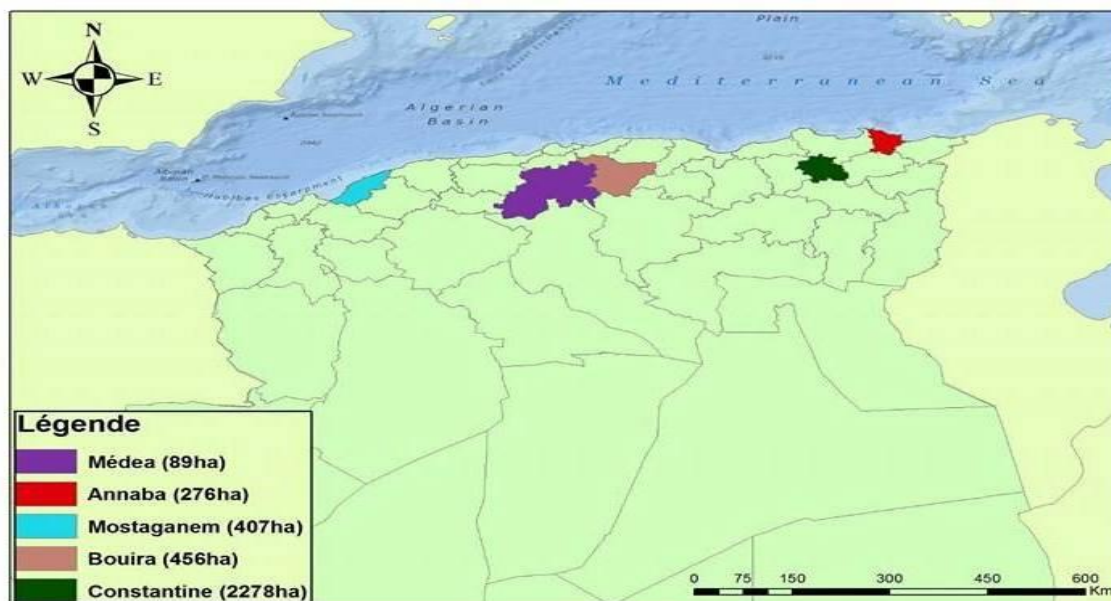


Figure 05 : Répartition géographique des plantations du pin pignon en Algérie.

I.6. La composition chimique des graines de *Pinus pinea L.*

Les pignons méditerranéens sont reconnus pour leur valeur nutritionnelle et leurs bienfaits pour la santé. En raison de leur large domaine d'usage médicinal et thérapeutique. Plusieurs études phyto-chimiques ont été effectuées dans le but d'identifier ses principes actifs et de nombreux travaux ont mis en évidence la richesse des extraits de ces graines en plusieurs composants hétérogènes (Nasri et al., 2005).

D'après les travaux de 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 les acides gras insaturés l'acide oléique, linoléique, tandis que le principal acide gras saturé était l'Acid palmitique et l'acide stéarique, de 14,25% des protéines, de 1,16% des sucres de 7,99% des poly phénols totaux et de 2,17% des flavonoïdes avec un taux d'humidité de 8,47%.

Tableau II : propriétés physicochimiques et compositions des grains de *Pinus pinea L*
(Kadri et al, 2015).

Composition	Détermination des valeurs
Humidité	8,47%
Cendre	1,94 ± 0,187%
Lipides	19,78 %
Protéines	14,25 %
Sucres	1,6 %
Minéraux (mg/100 g)	
Phosphore	440 ± 2,31
Magnésium	270 ± 0,863
Potassium	295 ± 0,431
Calcium	144 ± 0,234
Sodium	70 ± 0,053
Zinc	62,1 ± 0,734
Fer	73 ± 0,923
Cuivre	25.6 ± 0,452
Poly phénols totaux	7,99 %
Flavonoïdes	2,17 %

I.7. Usages multiples et activités biologique

La plupart des pins sont considérés comme une source importante de composés bioactifs structurellement divers et ont contribué à la découverte d'agents pharmaceutiques et d'autres applications biomédicales (Šarac et al., 2014).

Le pin pignon est bien connu depuis l'antiquité pour ses amandes qui sont très riches en acide oléique, un acide gras mono insaturé qui contribue à abaisser le niveau des LDL (mauvais

cholestérol), sans affecter les HDL (bon cholestérol) et les triglycérides (**Agrimi and Ciancio, 1993**).

Les Huiles essentielles de *P. pinea* L a des effets antifongiques et phytotoxiques. Elles sont utilisées comme pesticide et fongicide pour son origine naturelle, qui présente plus de bien-être pour les gens et l'environnement. (**Amri et al., 2012**) ; (**Amri et al., 2017**).

Elles sont bénéfiques pour les personnes atteintes de maladie cardiovasculaires. L'huile de pin pignon (extraite des pignons) apporte du phosphore, du fer et de la vitamine B1, très importante pour les systèmes nerveux et musculaire. C'est une huile que l'on qualifie de diététique car elle possède une action coupe-faim grâce à l'acide pinolénique. Elle est aphrodisiaque et utilisée pour le traitement de certains ulcères de l'estomac (**Seladji et al., 2014b**).

Les Pinus sont utilisés en médecine traditionnelle algérienne. Ils sont le plus souvent utilisés comme : Antiseptique puissant à action dynamisante ; recommandé dans toutes les infections des voies Respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires. Rubéfiant et balsamique, efficace dans les affections pulmonaires, la grippe, la sinusite, les rhumatismes (**Seladji et al., 2014a**).

Les métabolites secondaires

DES MÉTABOLITES SECONDAIRES

II.1. Les saponosides (saponines)

II.1.1. Généralité

Les saponines ou saponosides sont des hétérosides de stérol (substance contenant dans leur structure une ou plusieurs molécules de sucre) constituent une classe particulière de métabolites auxiliaires, des produit naturels découverts en abondance dans le domaine végétal (**Sparg et al., 2004**). Ce type de molécule a un potentiel pesticide stimulant, ce sont des substances à surface dynamique (tensio-actives), des glycosides. Ils sont créés essentiellement par les plantes supérieures, mais aussi par animaux marins inférieures et quelques créatures microscopiques (organismes microscopiques, bactéries) (**Francis et al., 2002a**) ; (**Das et al., 2012**), ils sont régulièrement utilisées par les consommation humains et animale (**Kren and Martínková, 2001**).

Leur nom saponine vient du mot grec « Sapona » ou du latin « **sapo** », il signifiant « **Nettoyeur ou Savon** » (**Samal et al., 2017**) en raison de leurs propriétés à former des arrangements moussants (propriétés permettant d'élaborer des solutions moussantes stables dans des solutions aqueux) (**Gauthier et al., 2008**). Les saponines isolées de diverses sources ont un goût amer et ont été utilisées comme des nettoyants, des détergents, des pesticides (**Abid et al., 2012**) et des molluscicides, malgré leurs applications industrielles en tant qu'agents moussants et tensioactifs naturels (surfactants).

II.1.2. Définition

Les saponosides (ou saponines) sont des hétérosides à génine stéroïdique ou triterpénique dont les solutions aqueuses ont des propriétés tensioactives (abaissement de la tension superficielle entre deux lipides) et aphrogènes (pouvoir moussant). La plupart des saponosides possèdent des propriétés hémolytiques et sont toxiques à l'égard des animaux a sang-froid (**Francis et al., 2002b**).

II.1.3. Distribution des saponines

Les saponines sont attribuées dans un large assortiment de produits alimentaires et dans plusieurs familles de plantes distinctes dont les asperges, lentilles, haricots, mûres, pois, pommes de terre, le fenugrec, le ginseng, la betterave à sucre et le thé. (**Dini et al., 2001**).

D'après **Oakenfull (1981)** et **Vincken et al. (2007)** les principales sources de saponines dans l'alimentation humaine sont les légumes. Nonobstant leur origine végétale, les saponines peuvent être acquises à partir de certains animaux marins, par exemple les étoiles de mer qui ont une place dans le groupe des Astéride des saponines triterpénique (**Dini et al., 2009**).

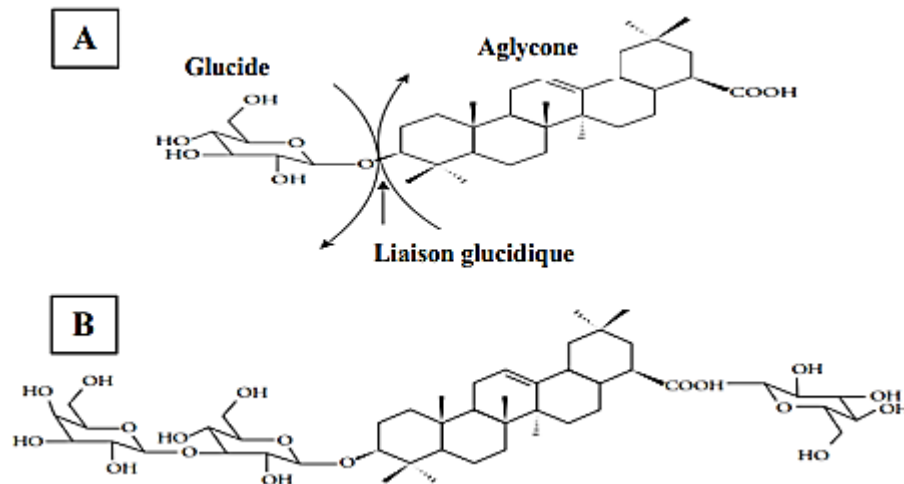


Figure 06 : exemple de structure de saponine.

A: Saponine monodesmosidique; **B**: Saponine bidesmosidique (**Ahumada et al., 2016**)

II.1.4. Classification et structure des saponines

La biosynthèse des saponines se fait à partir de 3 unités isoprènes, (particules contenant 5 molécules de carbone) connectée. l'une à l'autre dans une manière tête-à-queue (**Belloum, 2007**), entraînant l'arrangement d'une particule de farnésyl pyrophosphate (FPP) (particules contenant 15 molécules de carbone). Deux molécules de FPP sont ultérieurement connectées de façon queue-à-queue pour acquérir un composé de 30 atomes de carbone, appelé squalène (**Rejinold et al., 2011**). Ce dernier est oxydé en oxidosqualène.

Les saponines sont classées en deux groupes selon la nature de leur génine et leur pH

- 🌈 Saponosides à génine stéroïdique = Saponosides neutres.
- 🌈 Saponosides à génine triterpénique = Saponosides acides.

Ce sont des hétérosides complexes a poids moléculaire élevé appelés saponosides, qui font parties des terpènes cycliques ou stéroïdes. Par hydrolyse, ils libèrent un ou plusieurs oses et une génine appelée **Sapogénine**.

La combinaison de sucre et de stéroïde est dite saponine stéroïde. La combinaison de sucre et stéroïde alcaloïde (fonction azotée) est dite saponine alcaloïde stéroïde. La combinaison de sucre et triterpène est dite saponine triterpène.

➤ Structure de la partie aglycone (sapogénine)

Les saponines sont des molécules constituées de deux substances : une génine (également appelée aglycone) et une fraction glycoside. La partie aglycone (sapogénine) comprend un noyau stéroïde ou triterpénique (Figure 07) (Oakenfull, 1981) ; (Krief, 2003) et (Thakur et al., 2011).

Certains auteurs distinguent un troisième rassemblement appelé amines stéroïdiennes, (glycoalcaloïdes stéroïdiens) (Sparg et al., 2004).



Figure 07 : la partie aglycone de saponine (structure de base sapogénine) (Thakur et al., 2012).

• Saponines triterpéniques

Les saponines triterpénoïdes comprennent un aglycone triterpénoïdes, une génine triterpénique possèdent un squelette a C30, formé d'un noyau tétracyclique de type **Dammarane** qui est un intermédiaire évoluant vers des squelettes pentacycliques de type : **Oléanane** (β -amyrine), **Ursane** (α -amyrine) et **Lupane** (Yücekutlu et Bildacı., 2008). La plupart des saponines triterpénique sont découvertes fondamentalement dans les plantes dicotylédones mais en plus dans certaines monocotylédones (Mert-Türk, 2006), qu'elles soient sauvages ou cultivées.

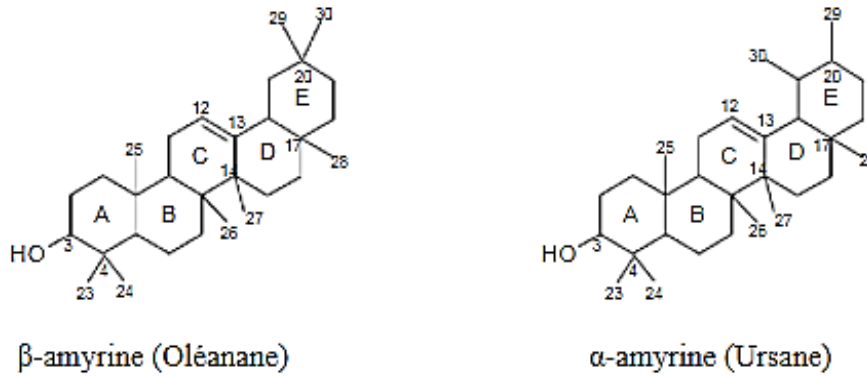


Figure 08 : les principaux squelettes triterpéniques.

Les saponines triterpénoïdes ont été détectées dans de nombreux légumes comme le soja et les haricots, les pois, le foin et les lentilles (*Lens culinaris*) et le thé, les épinards, la betterave à sucre, le quinoa, la réglisse, le tournesol, le marronnier d'Inde et le ginseng. Les squelettes de sapogénine triterpénique les plus répandus sont ceux de l'Oléanane et du Ursane (figure 08) (Lautrette et al., 2004).

- **Saponines stéroïdiques**

Les saponines stéroïdiennes comprennent un stéroïde aglycone, une génine stéroïdique a un squelette de C27, impliquant généralement une structure "**spirostane**" à six toriques (6 cycles) (Fig. 09 et 10 A), Les cycles A, B, C, D : Noyau stéroïdique, en C17 présence de 2 anneaux hétérocycliques : le cycle E (furanique) et F (pyranique), en C3 : alcool secondaire.

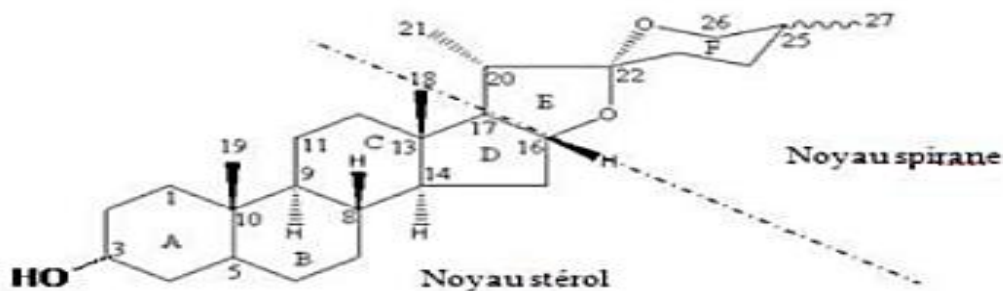


Figure 09 : Squelette de base des génines stéroïdiques (noyau spirostane) (Yu et al., 2001a)

Dans les plantes fraîches, le groupe hydroxyle en position C26 est occupé par une liaison glycosidique, et donc la structure aglycone reste pentacycliques (peut être engagé dans une liaison avec un ose). Ce site est considéré comme un furostane (Fig. 10 B). Le troisième groupe de sapogénine stéroïdique est la nautigénine (Fig. 10 C)

(Benyagoub et al., 2017). Ce type de structure ne peut exister qu'à l'état d'hétéroside et son hydrolyse conduit spontanément à un dérivé spirostanique.

Les saponines à génine stéroïdique se rencontrent surtout chez les monocotylédones : Alliaceae, Dioscoreaceae, Amaryllidaceae (Yücekutlu and BİLDACI, 2008), beaucoup plus rarement chez les dicotylédones, comme la digitale, fenugrec, tabac (Yu et al., 2001b) et (Sparg et al., 2004).

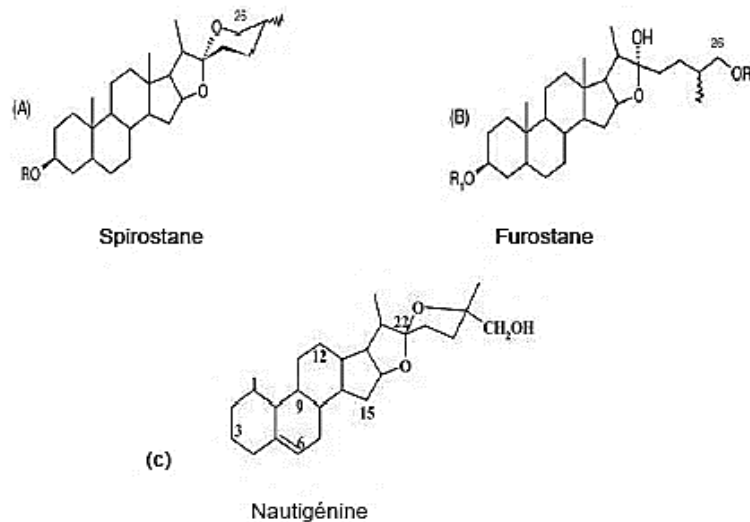


Figure 10 : les principaux squelettes stéroïdiques. (Li et al., 2001)

➤ Structure de la partie osidique

La fraction glycosidique contient généralement des oses ex : D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, D-fucose, et également des acides uroniques (acide D-glucuronique ou galacturonique) (Thibeault et al., 2007); (Saboora et al., 2019). Les saponines appartenant à un groupe équivalent peuvent avoir une énorme variation de squelette dans le nombre et le type de résidus de monosaccharides attaché (Vincken et al., 2007).

La plupart des saponines sont des monodesmosides ou des bidesmosides selon le nombre de chaînons osidiques, ce qui implique qu'elles contiennent soit 1 ou 2 chaînes de saccharides (oligosides linéaires ou ramifiées), respectivement, à différentes positions avec la liaison de type O-hétérosidique (Oleszek et al., 1992). Les chaînes oligosaccharidiques sont normalement reliées à C3 et / ou C17. Il existe quelques cas où les attaches de saccharides sont reliées à C4, C16, C20, C21 et, et ce sont des chaînes courtes de 1 ou 2 constructions (résidus) (Oleszek and Stochmal, 2002).

II.1.5. Mode de liaison (osidic-sapogénine)

L'aglycone (sucre) un morceau de molécule peut avoir jusqu'à 11 oses reliés à la génine par une sécurité acétal (liaison de type acétal) au niveau carbone C3 (monodesmosides). Cependant, deux parties glucidiques (bidesmosides) jointes à la positions C 3 et C 22, C 3 et C 28 ou C3 et C17 par une liaison ester ou éther. (**Krief et al., 2005**) ; (**Lautrette et al., 2004**); (**Vincken et al., 2007**) ; (**Yücekutlu and BILDACI, 2008**).

La liaison entre la partie osidique et la génine s'établit généralement par :

- La liaison osidique sur l'hydroxyle en C3 de la génine (liaison éther).
- Une seconde chaîne de sucre est parfois fixée sur un groupement COOH en C28 de la génine triterpénique par une liaison osidique-ester très fragile. Dans le cas des génines stéroïdiques, la deuxième chaîne osidique lors qu'elle existe se fixe par une liaison éther sur l'hydroxyle porté par C26 du furostane (hétérosides de furostanols).

II.1.6. Les activités biologiques des saponines

La présence de deux groupes polaires (sucre) et non polaires (stéroïde ou triterpène) confère aux saponines de fortes propriétés tensioactives qui sont responsables d'un grand nombre de ses effets biologiques indésirables et effets bénéfiques (**Yücekutlu and BILDACI, 2008**).

- **L'activité hémolytique (sur la membrane cellulaire)**

Les saponines sont connues depuis longtemps pour leur capacité à induire la formation de pores dans les membranes cellulaires et ainsi provoquer l'hémolyse des globules rouges (érythrocytes). Cette propriété a conduit à l'apparition de tests hémolytiques permettant de détecter les saponines dans les extraits de plantes (**Li et al., 2001**; **Sparg et al., 2004**). Cette activité hémolytique est généralement expliquée par l'interaction des saponines avec les stérols de la membrane cellulaire des érythrocytes, notamment le cholestérol, avec lesquels elles forment des complexes insolubles (**Das et al., 2012**).

Les monodesmosides ont une meilleure activité hémolytique que les bidesmosides, et cette activité diminue lorsque la chaîne osidique s'allonge (Lautrette

et al., 2004). La plupart des saponines ont des propriétés hémolytiques et sont toxiques pour la plupart des animaux à sang froid (**Sparg et al., 2004**).

Néanmoins, les saponines affecteraient la perméabilité des cellules muqueuse de l'intestinale grêle et auraient donc un impact sur le transport des nutriments actif. Il a également été démontré que les saponines inhibent diverses enzymes digestives, notamment la trypsine et la chymotrypsine, et sont également connues pour inhiber la dégradation des protéines en formant le complexe saponine-protéine (**Makkar et al., 2007**).

- **L'activité anti-inflammatoire**

L'inflammation a été définie comme la réponse de l'organisme à une agression tissulaire, qui peut être d'origine variée (infectieuse, tumorale, immunologique, chimique, physique, etc.). Elle peut être au départ focalisée (brûlures, abcès ou nécroses ischémiques) ou d'emblée systémique (infections virales, troubles immunologiques) (**Zhang et al., 2009**); (**Maier et al., 2005**). Les type de l'inflammation, inflammation aigue, inflammation chronique, inflammation induite par la carragénine : le carragénine est un polysaccharide extrait des algues rouges marine (classe des Rhodophycées), elle est utilisée pour induire une inflammation biphasique, liée à l'activation des COX. L'œdème de la patte du rat provoquée par elle un outil très sensible pour évaluer l'inflammation aigue, car elle provoque des rougeurs, gonflement, chaleur et des douleurs dans la patte œdémateuse (**Chen et al., 2018**); (**Hafeez et al., 2013**).

L'inflammation se caractérise par une rougeur, un œdème, de la fièvre, une douleur et une perte de fonction (**Hafeez et al., 2013**); (**Fablet and Madec, 2009**) et doit être rapide, dirigeable et spécifique afin d'éviter une suractivation des troubles inflammatoires, qui développent des maladies diverses ; diabète, thrombose, cancer... (**Zhou et al., 2017**).

Anti inflammatoire est distingués en deux type, anti inflammatoire stéroïdiens (AIS) et anti inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont définis comme un ensemble de médicaments qui réduisent ou éliminent les résultats de la réponse inflammatoire (**Tréchet and Jouzeau, 2014**). Les saponines isolées de la partie aérienne de *Dianthus barbatus* présentent des activités analgésiques (**Ajibade and Famurewa, 2012**) et anti-inflammatoires (**Tian et al., 2020**).

- **Activité cytotoxique et antitumorale**

De nombreuses saponines possèdent une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses notamment l'aristatoside C et la davisianoside B (Sarikahya et al., 2018).

- **Activité immunomodulatrice**

Les saponines, de façon générale, ont montré une aptitude à contrôler les cellules malignes, en inhibant leur croissance ou en déclenchant l'apoptose grâce aux différents mécanismes. Des saponines triterpéniques isolées des espèces appartenant au genre *Cephalaria* ont montré un rôle immunomodulateur *in vitro* et lymphoprolifératif sur les cellules leucémiques humaines (Sarikahya et al., 2021).

- **Autre activité biologique**

Les différentes activités biologiques des saponines sont regroupées dans le tableau III.

Tableau III : Les différentes activités biologiques des saponines

Activité	Référence
Antivirale, Antifongique	(Abid et al., 2012; Chaieb, 2010)
Hypoglycémique	(Yoshikawa et al., 2001)
Insecticide	(Chaieb, 2010)

II.2. Les hydroalcooliques (tannins)

II.2.1. Généralité et définition des tannins

Les tanins sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en matériau imputrescible, le cuir (Bruneton, 1999b). Cette propriété tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tanin et les fibres de collagène de la peau. D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par (Bate-Smith, 1973a): "composés phénoliques hydrosolubles dont

Le poids moléculaire relative (PM) est compris entre 500 et 3 000 Da et qui présente, en plus des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines" (**Fogliani et al., 2005**). Ils sont solubles dans l'eau, alcool et l'acétone mais insolubles dans l'éther (**André et al., 1981**). Bien que cette définition reste valable, elle a été complétée par des méthodes d'analyse récentes qui ont permis d'éclaircir la structure de ces polyphénols. Ainsi, les tanins sont maintenant définis comme des polyphénols dont le poids moléculaire peut atteindre 20 000 Da (**Hartzfeld et al., 2002**). En fonction de leur structure biochimique, il est habituel de différencier deux classes de tanins : les tanins hydrolysables (THs) et les tanins condensés (TCs) (**Hajriani, 2020**).

II.2.2. Localisation et distribution

Les tanins sont présents en une grande quantité chez les arbres, dans les écorces, les racines, les feuilles, les fruits et les graines (**Mehraz, 2017**). Ils sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles les conifères, les fagacées, les rosacées (**Boudjenna et al., 2020**). Ils sont placés dans les vacuoles de cellules. Les tanins exercent une action antioxygène ; ce qui explique la bonne conservation de certains bois (**Sepúlveda et al., 2011**).

II.2.3. Classification biochimique

Chez les plantes supérieures, il est habituel de distinguer deux groupes de tanins en fonction de leur structure biochimique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 1999a**); (**Hagerman, 2002**) Les tanins hydrolysables (THs) sont des oligo- ou polyesters d'un sucre, généralement du glucose, et de molécules d'acide-phénol (**Bruneton, 1999a**); (**Mueller-Harvey, 2001**) En général, les THs ont un faible PM. Cependant, les couplages oxydatifs entre THs peuvent produire des polymères d'un PMs important (**Mueller-Harvey, 2001**). Les tanins condensés (TC) sont appelés proanthocyanidines car leur oxydation en milieu alcool-acide conduit à la formation de pigments anthocyanidiques tels que les cyanidines (à partir des procyanidines) et les delphinidines (à partir des prodelphinidines) (**BRUNET**).

a. Tannins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont formés par estérification d'une molécule glucidique (souvent du glucose) avec un nombre variable de molécules d'acide

phénolique (Clifford et al., 2013). Ces molécules sont soit acides gallique dans le cas des tanins galliques soit de l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas de tanins ellagiques. Ils sont facilement dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou par hydrolyse enzymatique (AYADI, 2014) ; (Cao et al., 2010).

a. Tannins condensés

Les tanins condensés résultent de la polymérisation de molécule flavan-3-ols (catéchols ou catéchines) ou de flavan-3,4- diols (leucoanthocyane ou proanthocyanidols) (AYADI, 2014). Ils résulteront également de l'union de ces deux sortes de types de molécules, à partir de la polymérisation auto-oxydante ou enzymatique de flavan-3,4-diols liés principalement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et sont donc appelées proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et une autre liaison éther entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dites de type A (Jati, 2009). Ils diffèrent fondamentalement des tanins galliques et ellagiques par leur structure qui est voisine de celle des flavonoïdes. Ils sont caractérisés par l'absence de sucre dans leurs molécules, ne sont pas hydrolysables et ont au contraire, tendance se polymériser (notamment en solution acide concentrée ou par l'action d'agents oxydants) (Khanbabaee and Van Ree, 2001b).

b. Tannins galliques (Gallo tanins)

Ils sont donnés par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique. Il possède des liaisons esters avec des acides galliques qui se forment autour d'un sucre (D-glucose) ; les fonctions hydroxyl (-OH) des résidus polyoliques sont substituées par des unités galloyles.(Bate-Smith, 1973b).

c. Tannins ellagiques (Ellagitanins)

L'ellagitanin ou tanin ellagique est une molécule formée autour de HHDP (Acid hexahydroxydiphénique) et comporte des liaisons esters avec l'hydroxyl (-OH), l'HHDP est une combinaison de deux acides galliques. Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique. (Khanbabaee and van Ree, 2001a).

II.2.4. Les activités biologiques de tannin (propriétés biologiques)

Les propriétés biologiques des tanins sont dérivées de leurs propriétés physico-chimiques. L'une des conséquences directes du pouvoir des tanins sur les protéines complexes est l'inactivation des enzymes soit directement, par fixation aux sites actifs, soit indirectement par l'encombrement stérique créé par la liaison des molécules de tanins sur l'enzyme (**Zimmer and Cordesse, 1996b**). On rapporte que certains médicaments à base de tannins (drogues à tannins) possèdent des effets antimicrobiens (**Mimouna and Meriem**) antifongiques (**Baba-Moussa et al., 1999**) ou antiviraux (**Bourkache, 2016**). Néanmoins, les applications actuelles en thérapeutique restent limitées (**Zimmer and Cordesse, 1996a**).

- **Activité antioxydante**

Les tannins ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur des protons et accepteur des radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation (**Liang et al., 2020**) comme les procyanidines (**Lou et al., 2018**).

- **Activité anti-diarrhéique**

Par voie interne, les tanins exercent un effet anti-diarrhéique qui est dû à l'inhibition de la motilité intestinale. Toutefois, en utilisant la voie externe, ils imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et les muqueuses protégeant ainsi les couches sous-jacentes (**Djahra et al., 2013**).

- **Activité antimicrobienne**

Les tanins ont été rapportés comme bactériostatique ou bactéricide sur plusieurs souches bactériennes. L'acide tannique peut inhiber la croissance des bactéries des aliments et des bactéries intestinales humaines (**Djahra et al., 2013**).

- **Activité antivirale**

L'activité antivirale des tanins est due à la fixation des molécules des tanins à l'enveloppe protéique du virus (**Olchowik-Grabarek et al., 2020**), ou la membrane de la cellule hôte, et par conséquent l'inhibition de l'adsorption et la pénétration virale (**Sekowski et al., 2020**).

Etude Expérimentale

Etude Expérimentale

Matériels et méthodes

I. Matériel

I.1. Réactifs et appareillage

Le matériel et les réactifs utilisés pour l'extraction et l'évaluation des activités biologiques sont reportés en (Annexe 01).

I.2 Matériel végétale

Les graines de *Pinus pinea* L. ont été récoltées du parc national de Chréa, wilaya de Blida. Les graines entières ont été lavées avec de l'eau distillée, séchées à l'air libre puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre suivi d'un tamisage à travers d'un tamis de 200 μm .



Figure 11 : Les graines entières de *Pinus pinea* L. avant et après broyage (originale).

L'élimination de la fraction lipidique des graines de *Pinus pinea* L. est importante avant l'extraction des tannins et des saponines. Pour cette raison, la poudre des graines a été délipidée à l'aide d'un soxhlet pendant 6 h à 40°C en utilisant le *n*-hexane comme solvant à un rapport échantillon : solvant (1 :10 m/v). La poudre a été récupérée et séchée sous hôte puis tamisée en utilisant un tamis de 200 μm .

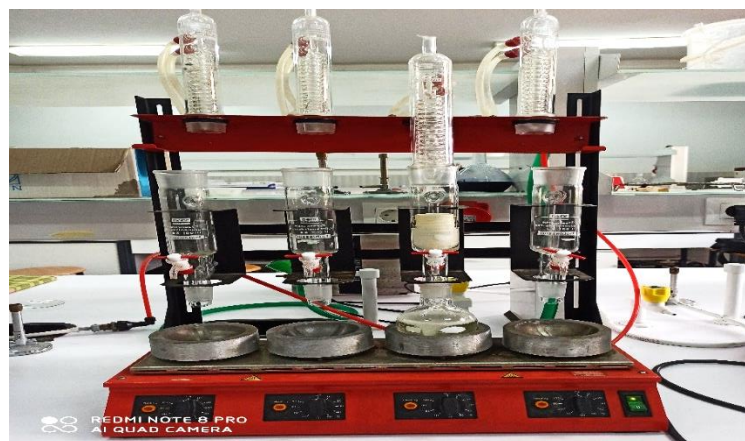


Figure 12 : Appareillage de soxhlet (originale).

I.3. Matériel animal et condition d'élevage

L'étude *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire des différents extraits (tannin et saponine) a été effectuée sur des souris males *Swiss albinos* dont le poids varie entre 20 et 30 g. Ils ont été procurés du Centre de Recherche et de Développement (CRD) de SAIDAL, Alger. Les souris ont été hébergés dans des cages polypropylènes au niveau de l'animalerie dans des conditions d'éclairage normales 12 h / 12 h de cycle lumière / obscurité. Les locaux sont dotés d'une climatisation dynamique avec une température de 22 ± 1 °C, avec un taux d'humidité relative de $55 \pm 10\%$. Les cages sont dotées d'une alimentation standard en granulés et de l'eau *ad libitum*.



Figure 13 : photographie du lieu d'élevage des souris *Swiss albinos* (originale).

I.4. Matériel microbiologique

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des tannins et des saponines des graines entières de *P. pinea* L., six souches microbiennes ont été testées dont 4 souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp* de Gram négatif et *Staphylococcus aureus* de Gram positif) et deux souches fongiques (*Aspergillus brasiliens* et *Candida albicans*) provenant essentiellement du laboratoire de contrôle de qualité de département microbiologie de SAIDAL-Dar El Beida.

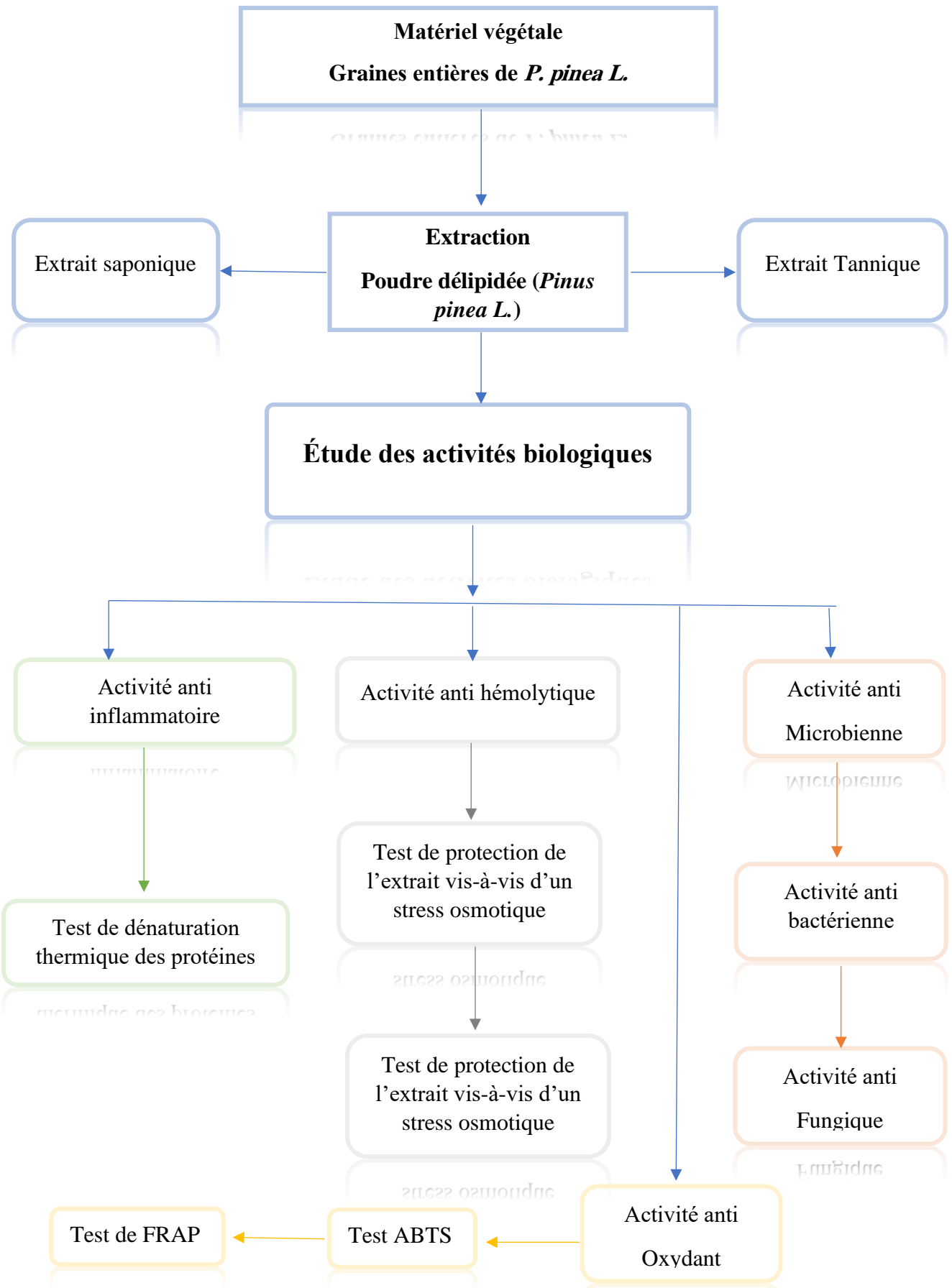


Figure 14 : schéma récapitulatif des protocoles expérimentaux adoptés.

II. Méthodes

II.1. Extraction des saponines des graines de *P. pinea* L.

➤ Principe de l'extraction solide-liquide et l'extraction liquide-liquide

L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide on peut utiliser successivement des liquides dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent (dissolution fractionnée).

L'extraction liquide-liquide discontinue, du fait que l'eau ne s'évapore pas facilement, l'espèce chimique est difficilement récupérable si elle est en solution dans l'eau. Dans ce cas, il faut utiliser un solvant organique dans lequel la substance est très soluble (beaucoup plus que dans l'eau), celle-ci va passer de l'eau au solvant organique. Il faut que l'eau et le solvant organique ne soient pas miscibles. L'extraction liquide-liquide discontinue est une opération consiste à transférer un composé d'une phase aqueuse a une phase organique ou inversement, en utilisant pour cela deux solvants (l'un aqueux et l'autre organique), non miscibles, mis en contact intime. Elle est réalisée grâce à des ampoules à décanter, telle que les ampoules ayant la tubulure au-dessus du robinet sont les plus utilisées, car elles permettent de mieux visualiser l'interface et donc mieux séparer les deux phases.

➤ Protocol expérimental

L'extraction des saponines a été réalisée comme décrit par **Raji et al. (2019)**. Une masse de 10g de poudre délipidée des graines de *P. pinea* L. a été mélangée avec 100 ml d'éthanol (20%), le mélange a été mis dans un bain marie à 70°C sous agitation continue pendant 4h, puis centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min. Le surnageant a été concentré à un volume de 40 ml environ dans une étuve à 40°C.

Dans une ampoule à décanter, 50 ml d'éther di-éthylique ont été ajoutés au surnageant concentré. La phase aqueuse a été récupérée et mélangée avec 60 ml de *n*-butanol et lavée avec 10 ml de NaCl 5%. Le mélange a été décantée de nouveau, la phase organique qui contient les saponines a été récupérée et évaporée dans une étuve à 40°C.

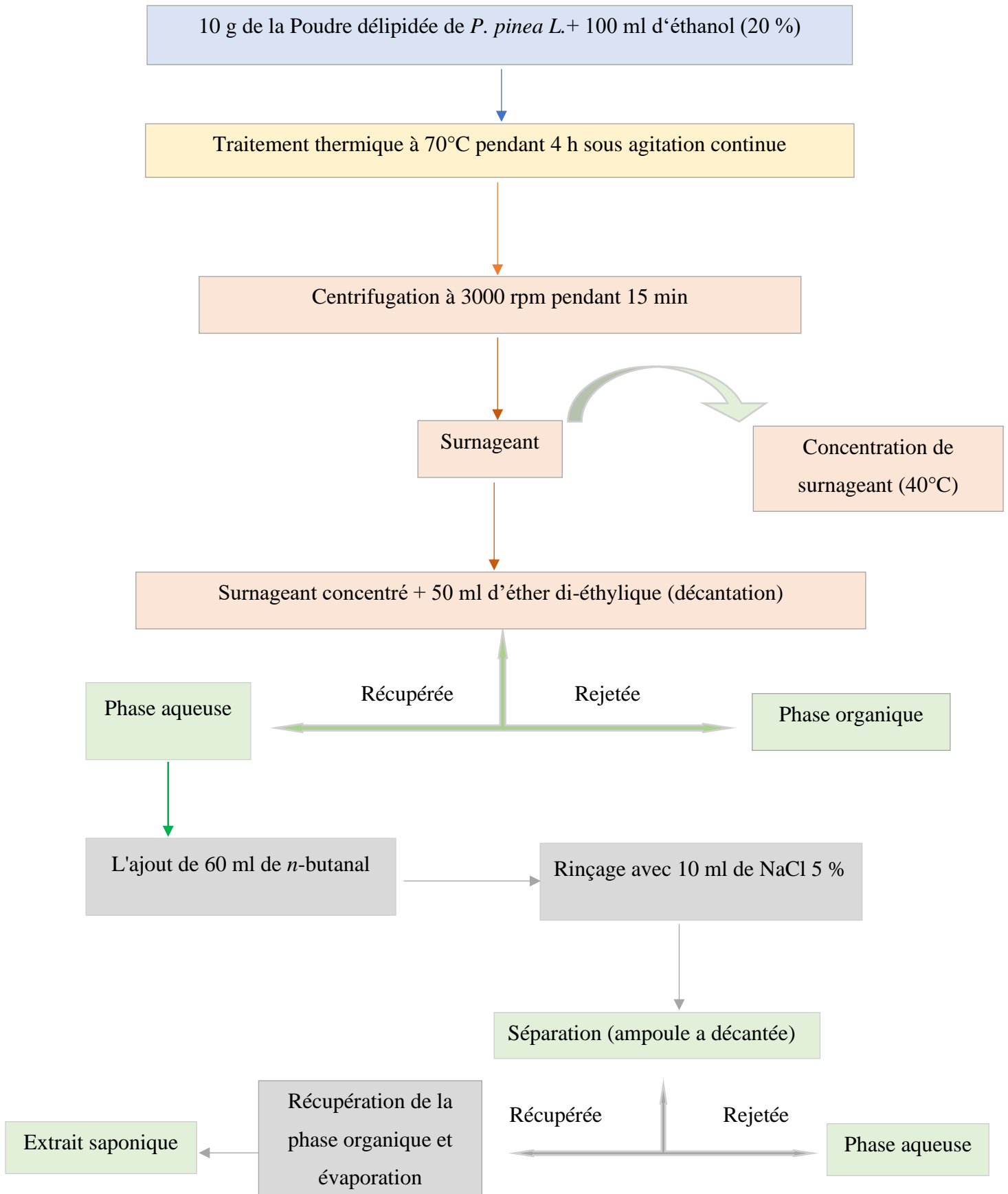


Figure 15 : protocole d'extraction des saponines des graines de *Pinus pinea* L.

II.2. Extraction assistée par ultrasons des tannins des graines de *P. pinea* L.

➤ Principe d'extraction

L'extraction assistée par ultrasons consiste à traiter sous ultrasons un solide, sec ou humide, En contact avec un solvant. Le phénomène des ultrasons consiste à créer des bulles de cavitation dans le solvant permettant de dénaturer la paroi de la cellule végétale. Les ultrasons permettent d'accélérer l'extraction et de réduire le ratio solvant / soluté, ce qui conduit à un meilleur rendement d'extraction des composés bioactifs (**Cheok et al., 2014**).

Plusieurs types d'équipements à ultrasons sont couramment utilisés dans les laboratoires. Pour extraire les tannins à partir des graines entières des *P. pinea* L., un bain à ultrasons a été utilisé.



Figure 16 : Extraction des tannins par le bain à ultrasons (originale)

➤ Protocol expérimentale

Le Protocol d'extraction a été décrit par **Cheurfa and Allem (2015)** en y apportant quelques modifications. Dans un bécher, un volume de 100 ml d'acétone a été ajouté à 5 g de poudre délipidée et placé dans un bain à ultrason à 50 °C. Après 20 minutes d'extraction, l'extrait des tannins a été récupéré par filtration sur papier wattman. Le filtrat obtenu a été concentré à l'étuve à une température de 40°C.

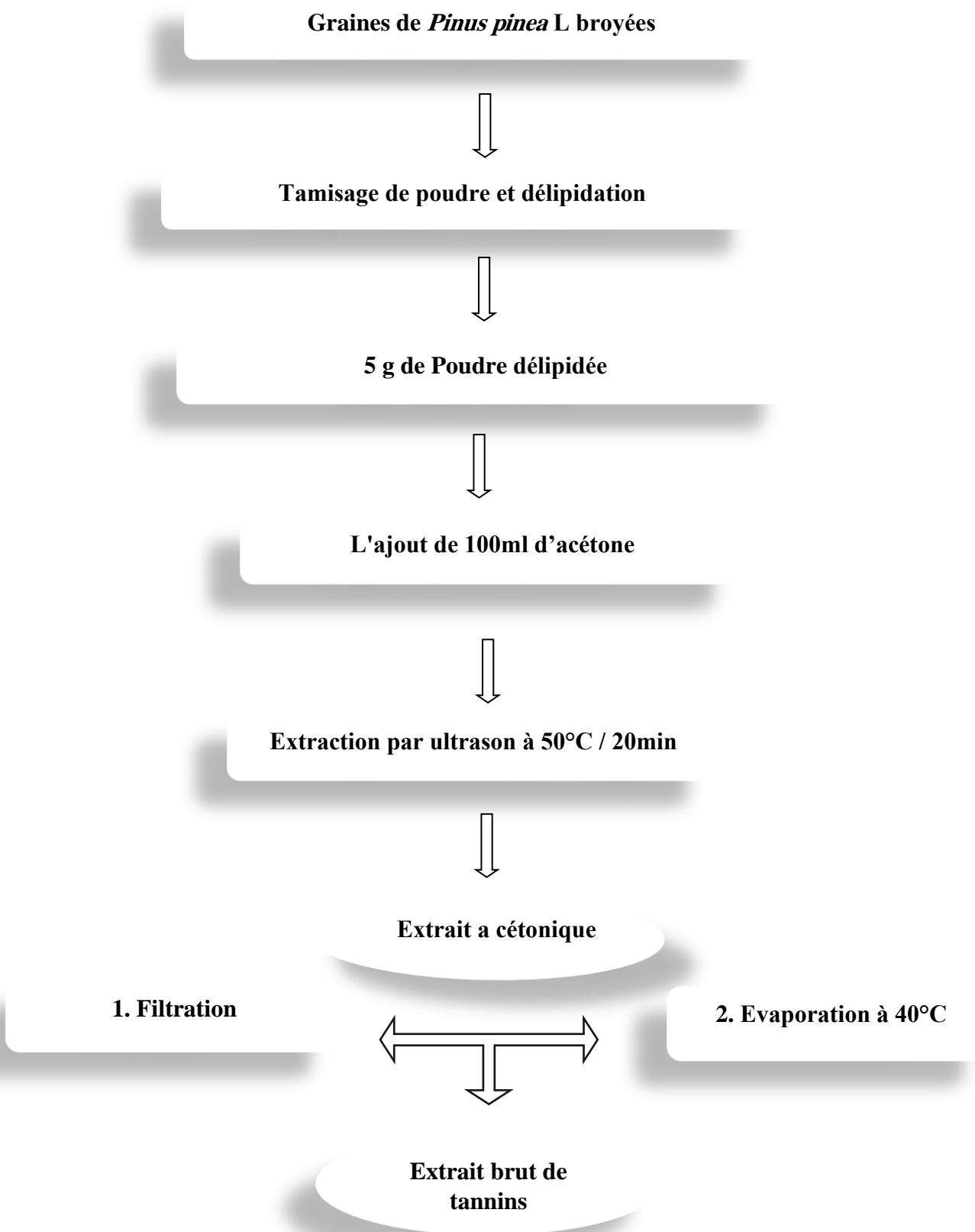


Figure 17 : protocole d'extraction assistée par ultrason des tannins de *Pinus pinea* L

II.3. Rendement des extraits de tannins et de saponines

Le rendement des extraits de tanin et de saponine est caractérisé comme la proportion entre la masse de l'extrait sec obtenu après évaporation et la masse de matériel végétal traité. Ce rendement est déterminé via l'équation :

$$R \% = Me / Ms \times 100$$

R% : Rendement en %.

Me : Masse du l'extrait après l'évaporation du solvant.

Ms : Masse de la plante sèche.

II.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits de *Pinus pinea* L. (Essai)

L'activité antimicrobienne des deux extraits (tannins et saponines) des graines de *P. pinea* L. contre les microorganismes testés dans la présente étude a été qualitativement et quantitativement évaluée en fonction de la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition et le diamètre de cette zone.

❖ Préparation de l'inoculum

A partir des cultures jeunes préparées, on prélève quelques colonies des bactéries dans 10 ml de milieu de culture trypto-caséine soja. On agite ensuite les tubes au vortex pendant quelques secondes. Les suspensions microbiennes lissier cultiver pendant 24 h dans l'étuve.

❖ Préparation des milieux de culture avec des suspensions microbiennes

Cette étape consiste à liquéfier le milieu de culture trypto-caséine soja pour les (bactérie et champignons) dans un bain marie, puis, on coule aseptiquement les milieux en sur fusion dans des boites de pétri a raison de 6 mm par boite. On laisse refroidir et solidifier sur la pailleuse puis, on réalise l'ensemencement par écouvillonnage à l'aide râteau ou bien coton-tige stérile contenue des suspensions microbiennes et on verse en tournant la boite.

❖ Dépôt de disques

Une fois le milieu de culture qui contient les suspensions microbiennes est solidifié, on prélève aseptiquement à l'aide d'une pince stérile 4 disques absorbant stérile de 9 mm et on

l'imbibe avec 50 μ l de quatre concentrations de chaque extrait de *Pinus pinea L.* à tester, puis on le dépose sur la gélose préalablement préparée (2 boîtes pour chaque espèce).

Un disque préparé imbibé de DMSO est utilisé comme contrôle négatif, et 2 disques des antibiotiques Nystatine et Amoxicilline sont utilisés comme contrôle positif (3 boîtes/espèce).

❖ Incubation

On incube les boîtes de Pétri à 37 °C pendant 24h pour les bactéries, et 48h pour l'espèce fongique (Lahoum et al., 2016)

❖ Lecture des résultats

La lecture des résultats est effectuée en fonction de l'existence ou non des zones d'inhibition. La sensibilité des espèces est estimée par la mesure de diamètre de zone d'inhibition autour des disques imprégnés de différentes concentrations des deux extraits hydroalcoolique et saponique de la plante.

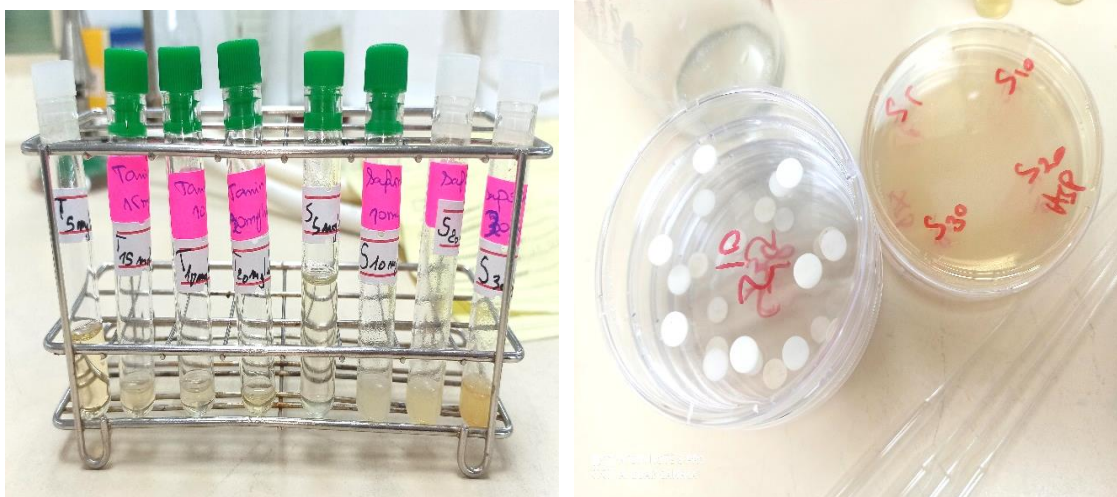


Figure 18 : les différentes concentrations des extraits testées par la méthode de diffusion en milieu solide (originale).

La méthode de diffusion en milieu solide a été appliquée afin d'évaluer la sensibilité des bactéries vis-à-vis les deux extraits de *P. pinea L.* testés et leurs effets antimicrobiens.

Des disques de papier filtre stérile de 9 mm de diamètre ont été imprégnés d'un volume de 50 μ l de chaque extrait préparé à différentes concentrations (5,10 ,15 ,20 mg/ml) pour l'extrait de tannin et (5, 10, 20, 30 mg/ml) pour l'extrait de saponine. Les disques ont été déposés par la suite à la surface du milieu de culture en présence d'un disque imbibés d'une solution

Matériels et Méthodes

aqueuse de DMSO (Diméthylsulfoxyde) servant comme un témoin négatif pour chaque souche examinée.

Des disques d'amoxicilline (antibiotique) commercialisée (à 10µg/ disque) et des disques de Nystatine (antifongique) (10µg/ disque) ont été utilisées comme des témoins positifs. Les boîtes de pétri ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 22 °C pendant 48h pour les champignons.

L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition en millimètres autour de chaque disque de papier.

Tableau IV : listes des souches microbiennes utilisées.

Famille	Genre et espèce	Gram	Pouvoir pathogène
Entérobactéries	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	-Infection urinaires -Gastroentérites
Staphylococcies	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	-infection nosocomiale -infection cutanées
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	-mucoviscidose, maladie pulmonaire, colonise l'épithélium respiratoire
Entérobactéries	<i>Salmonella spp</i>	Négatif	-fièvre typhoïdes ou paratyphoïdes
Trichocomaceae	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		Champignons pathogènes, aspergilloses
Saccharomycetaceae	<i>Candida albicans</i>		-infections viscérales, Candidose superficielles, Septicémies

II.5. Évaluation de l'activité anti-hémolytique *in vitro* des extraits

L'utilisation des globules rouges pour l'évaluation de l'activité anti-hémolytique est motivée par le fait qu'ils soient admis comme modèle cellulaire en recherche scientifique et qu'ils partagent des similarités avec d'autres membranes cellulaires, notamment celle du lysosome (Shobana and Vidhya, 2016).

L'objectif de cette étude est de mesurer le pouvoir des extraits de tannins et de saponines à empêcher l'hémolyse des globules rouges humains (GRh), induite par un stress osmotique et thermique. L'exposition des érythrocytes à une concentration saline hypotonique et à la chaleur entraîne la rupture de leurs membranes avec la libération de leur contenu cytoplasmique (hémoglobine). L'intensité de l'hémolyse est estimée en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée.

II.5.1 Préparation de la suspension érythrocytaire

Le sang utilisé pour la préparation des suspensions sanguines a été prélevé sur des sujets sains à l'hôpital Mohamed Boudiaf de Bouira. Une fois collectée dans des tubes héparines, les échantillons du sang ont été transportés au laboratoire dans une glacière à 4°C où ils ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C pour séparer les érythrocytes des autres composants sanguins. Après avoir éliminé le plasma, le culot érythrocytaire est lavé trois fois successivement avec du tampon phosphate (PBS) (pH 7,5 ; 0,9% NaCl). Par la suite, la suspension érythrocytaire a été préparée avec du PBS à une concentration de 2% (GRh : PBS).

II.5.2. Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress osmotique

L'effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress osmotique a été évalué en appliquant le protocole de **Aberrane and Mehalla (2019)** qui consiste à générer un stress osmotique en faisant varier les concentrations de NaCl (0,5, 0,7 et 0,9%).

Un volume de 300 µl de la suspension érythrocytaire à 2 % a été mélangé avec 300 µl de tampon phosphate (pH 7,5) préparé avec des concentrations variables de NaCl mentionnées ci-dessus, où chacun est combiné avec des concentrations variables des extrait (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 mg/ml).

Le mélange a été incubé pendant 30 min à 37°C sous agitation douce puis centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm.

L'acide salicylique (AS) a été utilisé comme un anti-hémolytique de référence. Son activité anti-hémolytique a été évaluée dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour les deux extraits.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé par l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de l'hémolyse (\%)} = (A1 - A2/A1) \times 100$$

A1 = Absorbance de la solution hypotonique de globules rouges sans l'extrait.

A2 = Absorbance de la solution hypotonique de globules rouges avec l'extrait.

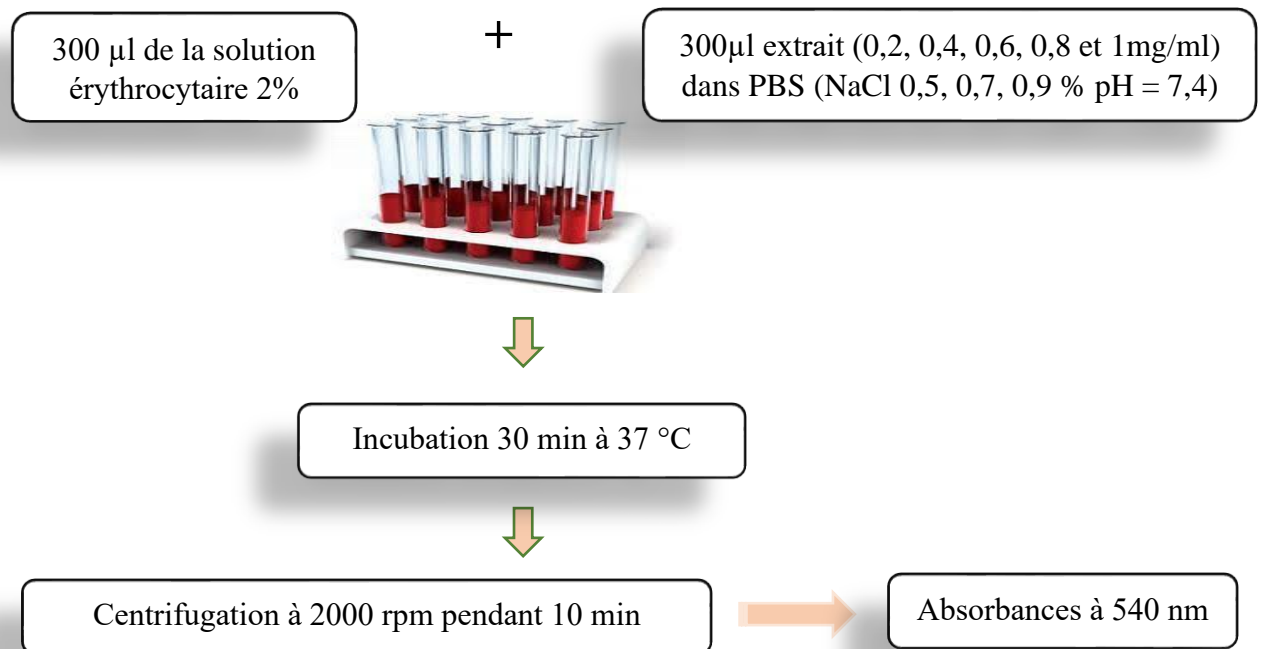


Figure 19 : Schéma récapitulatif des étapes de l'hémolyse induite par des solutions hypotoniques.

II.5.3 Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress thermique

L'évaluation de l'activité protectrice de l'extrait contre l'hémolyse induite par le stress thermique est réalisée *in vitro* par la méthode spectrophotométrique décrite par **Aberrane and Mehalla (2019)**. Un volume de 300 µl des extraits préparés à différentes concentrations (0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 0,8 g/ml) dissous dans du tampon phosphate (pH 7,5 ; 0,9 % NaCl) a été mélangé avec 300 µl de solution érythrocytaire (2%). Le mélange réactionnel a été incubé au bain-marie à 56°C pendant une demi-heure. Après incubation, les tubes ont été immédiatement refroidis à

l'eau de robinet, puis centrifugés à 2000 rpm pendant 10 minutes et l'absorbance de surnageant a été estimées à 540 nm.

Parallèlement, un control positif a été réalisé en remplaçant l'eau physiologique par 300 µl d'eau distillée provoquant ainsi une hémolyse totale (100 %).

L'effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress thermique a été comparé à celui de l'acide salicylique utilisée comme un anti-hémolytique de référence

Le pourcentage de protection contre l'hémolyse induite par la chaleur est calculé en utilisant l'équation suivante :

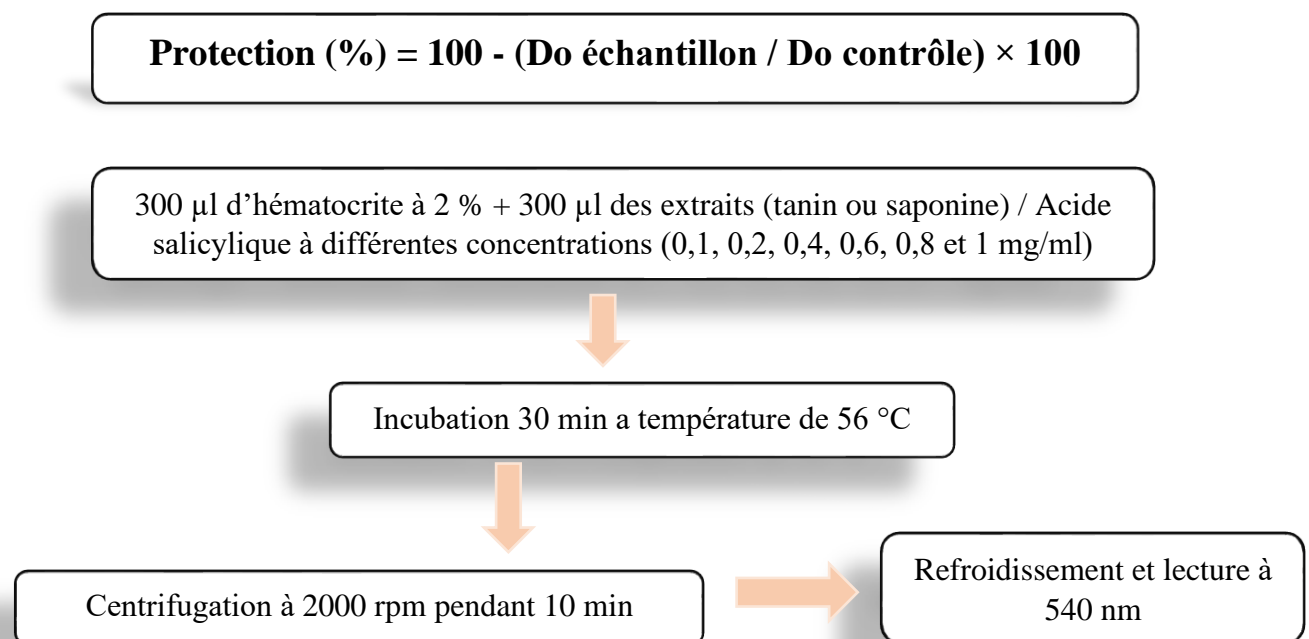


Figure 20 : schéma récapitulatif des étapes du test de protection contre d'un stress thermique.

II.6. Évaluation des activités antioxydantes des extraits de graine de *Pinus pinea* L.

II.6.1. Piégeage du radical libre ABTS

La méthode de piégeage du radical libre ABTS est basée sur la capacité des composés à réduire le radical cationique ABTS^{•+}. Le radical est formé par l'oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le persulfate de potassium (**Khan et al., 2012**).

Le test de piégeage du radical libre ABTS a été évaluée comme décrit par **Khan et al., 2012**. L'ABTS a été dissous dans l'eau distillée à une concentration de 7 mM. La solution du

radical cationique ABTS⁺⁺ a été obtenue en incubant pendant 12 à 16 h à l'obscurité et à la température ambiante un mélange a volumes égaux de la solution mère d'ABTS avec une solution de persulfate de potassium a 2,45 mM. La solution ABTS⁺⁺ a été diluée avec l'éthanol absolu jusqu'à l'obtention d'une absorbance de $0,700 \pm 0,02$ à 734 nm.

Un volume de 750 µl de la solution d'ABTS⁺⁺ fraîchement préparée a été mélangé avec 25 µl d'extrait (tanin / saponine) préparé à différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml). Les absorbances sont mesurées à 734 nm après une incubation de 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé. La différence d'absorbance entre la solution d'ABTS en présence et en absence de l'échantillon reflète le potentiel des composés responsables de cette activité à réduire ce radical.

L'activité de l'extrait a été comparée à celle des antioxydants synthétiques (Acide ascorbique, BHT et BHA).

Les résultats exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) et en CI₅₀.

$$PI (\%) = 100 (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{contrôle}}$$

A_{contrôle} : Absorbance du contrôle.

A_{éch} : Absorbance d'échantillon.

II.6.2. Le pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Beaucoup d'études ont indiqué d'une relation directe entre les activités antioxydants et le pouvoir réducteur (**Bentabet et al., 2014**). Cette méthode est utilisée pour évaluer le pouvoir réducteur des extraits à réduire le fer ferrique (Fe⁺³) en fer ferreux (Fe⁺²) (**Koula et al., 2014**).

Le test FRAP a été évalué selon le protocole décrit par **HAMDAOUI and HEDOU** (**2019**). Un volume de 80 µl d'échantillon préparé à différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml) ou des antioxydants synthétiques (acide ascorbique : 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 et 0,1 mg/ml) ; (BHT / BHA : 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 et 0,8) a été mélangé avec 250 µl de tampon phosphate (0,2 M ; pH=6,6) et 250 µl d'hexacyanoferrate de potassium à 1 %. Après une incubation dû à 50 °C pendant 20 min, 250 µl d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % a été ajouté pour stopper la réaction, les tubes sont ensuite centrifugés a 3000 rpm pendant 10 minutes.

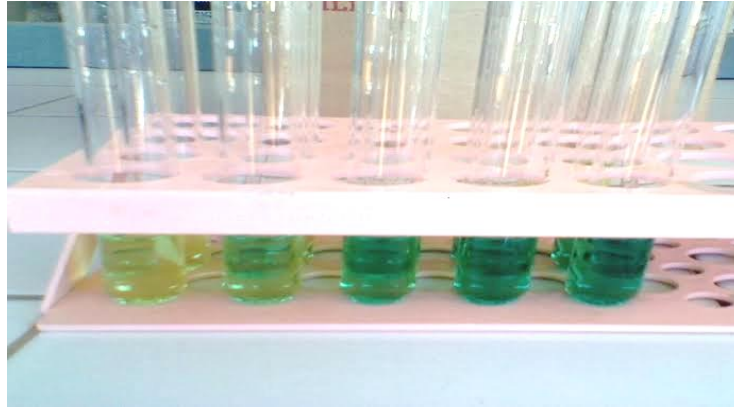


Figure 21 : test FRAP des extraits des graines de *P. pinea* L. (originale).

Ensuite, un volume de 500 μl du surnageant de chaque tube a été mélangé avec 500 μl d'eau distillé et 500 μl d'une solution de FeCl_3 à 0,1 %. Le mélange a été homogénéisé et laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 10 minutes avant de mesurer les absorbances à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Beddou et al., 2015**).

II.7. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits *in vivo*

➤ Principe

L'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire.

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire ou l'inhibition de l'inflammation après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondante (Diclofénac 75 mg).

➤ Mode opératoire

Le test consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits sur l'œdème des pattes postérieures après injection de la carragénine à 0,1 % sous l'aponévrose du coussinet plantaire chez les souris *Swiss albinos*.

Les souris ont été réparties en 4 lots de 5 souris, dont le poids corporel est compris entre 22 et 30 g. Ces souris ont été mises à jeun de 12 h à 16 h la veille du test. La préparation des solutions administrées est illustrée en (**Annexe 02**).

- **Au temps T_0** : Les souris des quatre lots ont été traitées comme suit :

Tableau V : Les différents traitements appliqués.

Lots	Traitement
Lot de témoin	Chaque souris reçoit par gavage 0,2 ml /s d'eau distillée.
Lot essai N° 1	Chaque souris reçoit par gavage 0,2 ml /s d'extrait de saponine à une concentration de 100 mg / ml.
Lot essai N° 2	Chaque souris reçoit par gavage 0,2 ml /s d'extrait de tannin à une concentration de 100 mg / ml.
Lots de référence	Chaque souris reçoit par gavage 0,2 ml /s de produit de référence (Diclofénac 75mg /Kg) à une concentration de 0,5 mg /ml.

- **Au temps T0 + 30 min** : induction d'œdème (ou inflammation) par injection de la solution de carragénine à 0,1% au niveau de la patte postérieure gauche au milieu l'aponévrose du coussinet plantaire sous un volume de 0,025 ml pour chaque souris.
- **Au temps T0 + 4h** : Les animaux ont été anesthésiés, après quelques minutes, les animaux ont été sacrifiés par une dislocation cervicale, puis les pattes gauches et droites ont été coupées à hauteur de l'articulation et pesées par une balance analytique.

➤ **Expression des résultats**

L'activité anti-inflammatoire est exprimée en variation de moyenne de poids de la patte droite et la patte gauche pour chaque lot et en pourcentage d'augmentation de l'œdème pour chaque groupe qui est calculé par la formule suivante (Sawadogo et al., 2008) :

$$\% \text{ de l'œdème} = (Mg - Md) / Md \times 100$$

Mg : moyenne des pattes gauches.

Md : moyenne des pattes droites.

Matériels et Méthodes

Ainsi, en pourcentage d'inhibition de l'inflammation qui est calculé chez les souris traitées par rapport au témoin par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'inflammation} = (\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}) / \% \text{ de l'œdème témoin} \times 100$$



Répartition des lots



Identification des souris



T0 Administration des différentes solutions par gavage

Après 30 min

Matériels et Méthodes



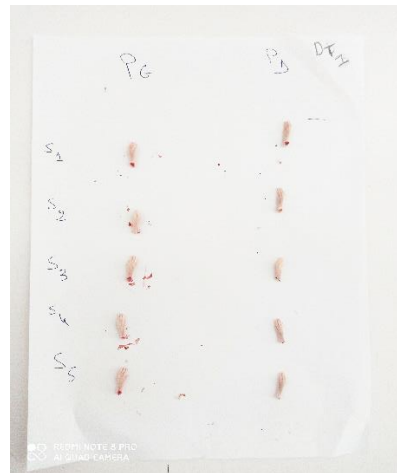
Injection de carragénine sous l'aponévrose du coussinet plantaire de la patte arrière gauche



Après 4 h



Faire une anesthésie aux souris et les sacrifier par dislocation cervicales



Découpage des pattes gouaches et droites à hauteur de l'articulation et les pesées sur une balance analytique



Figure 22 : schéma récapitulatif des étapes de l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux de *Pinus pinea* L (originale).

Résultat et discussion

I. Rendement d'extraction

L'extraction qui est une méthode préliminaire très importante est faite par l'acétone et ultrasons pour l'extrait hydroalcoolique et l'éthanol 20 % pour l'extrait saponique. D'abord le solvant d'extraction est le paramètre qui conditionne le type d'éléments qui vont être extraits. L'extrait aqueux nous a permis d'extraire à haute valeur biologique. Ces derniers se trouvent dissouts dans le solvant d'extraction et sont récupérées par évaporation.

Le rendement des extraits a été déterminé par rapport à 10 g de la matière végétale pour l'extrait saponique et 5 g pour l'extrait hydroalcoolique. De plus la poudre des deux métabolites secondaires est très fine (subit une étape de délipidation par le soxhlet), ce qui augmente la surface de contact avec le solvant, permettant ainsi une meilleure libération des principes actifs (Moure et al., 2000).

Tableau VI : Poids d'extraits secs et rendement correspondant des deux extraits tanins et saponines à partir des graines de *Pinus pinea* L.

Extraits	Poids d'extrait sec (g)	Rendement (%)
Tannin	0,887	8,87
Saponine	1,259	12,59

Le rendement correspond à la masse d'extrait après évaporation. Il se rapporte à la masse initiale de l'échantillon soumis à l'extraction et est exprimé en pourcentage. Dans notre travail les extraits obtenus avaient une consistance semi-solide plus ou moins visqueux dont l'extrait saponique a donné une couleur jaune clair avec un rendement de 8,87 %, ce taux est plus proche par rapport à celui rapporté par **BOUZAHER (2019)** avec un rendement d'extraction de *Chenopodium quinoa* 9,5 %.

Tandis qu'extrait hydroalcoolique (tannin) a donné une couleur marron foncé avec un rendement plus élève qui est 12,98 % (Tableau VI), ce taux est plus élevé par rapport à celui rapporté par **Pansera et al. (2004)** le rendement de l'extraction d'*Acacia mearnsii* était 9,5 %.

La méthode d'extraction dépendant aussi bien du matériel végétal que des molécules recherchées c'est-à-dire de la quantité des métabolites secondaires dans la plante est de l'aspect macroscopique de la poudre ; quand la quantité de ces métabolites augmente, et la poudre très fine, le rendement va augmenter. L'extraction est influencée par la méthode choisie en fonction

des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extraction individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure (Bonnaillie et al., 2012).

II. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits

Dans le but d'estimer le potentiel antimicrobien des extraits de tannins et saponines des graines de *Pinus Pinea* L., des tests *in vitro* ont été réalisés pour évaluer leur capacité antibactérienne et antifongique. Plusieurs souches cibles ont été choisies dans ce contexte, car chacune d'entre elles possède des structures cellulaires et un métabolisme spécifique.

La mesure de la capacité antimicrobienne a été effectuée par des antibiogrammes en milieu solide trypto-caséine de soja, qui mesurent la capacité d'un extrait à inhiber la croissance microbienne *in vitro*, suivis par des antibiogrammes en milieu solide des contrôles négatifs (DMSO) ou de l'eau par la méthode de diffusion en milieu solide.

II.1. Effet des extraits sur la croissance des souches microbiennes (fongiques et bactériennes)

Les résultats des tests antimicrobiens des extraits de tannins et de saponines des graines de *Pinus Pinea* L. sont regroupés dans les tableaux ci-dessous, et illustrés par les figures (01, 02, 03, 04, 05 et 06) (Annexes 03).

L'activité antimicrobienne vis à vis des micro-organismes analysés dans la présente étude a été évaluée qualitativement et quantitativement en fonction de la présence ou l'absence de zones d'inhibition et le diamètre de la zone par rapport à l'amoxicilline et à la Nystatine utilisés comme antibiotique et antifongique de référence, respectivement. (Hadjer and Ibtissam, 2017).

La variation de la sensibilité microbienne vis-à-vis de l'extrait tannique des graines de *P. pinea* L. est confirmée par l'existence de différences dans les diamètres d'inhibition aux diverses concentrations d'extrait, comme l'indique le tableau ci-dessous.

L'extrait tannique s'est révélé actif envers cinq souches microbiennes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica ssp*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) mais à des degrés différents et inactif envers une seule souche bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*).

Tableau VII : Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis-à-vis de l'extrait tannique des graines de *Pinus pinea L.* à 5, 10, 15 et 30 mg/ml.

Les souches	Témoins (mm)			Zone d'inhibition (mm)			
	DMSO	Nystatine	Amoxicilline	Concentrations (mg/ml)			
				5	10	15	30
<i>E-coli</i>	R	/	33 (S)	00 (R)	00 (R)	14 (S)	16 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	/	34 (S)	00 (R)	11 (S)	00 (R)	00 (R)
<i>Salmonella enterica ssp</i>	R	/	34 (S)	00 (R)	14 (S)	17 (S)	13 (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	/	36 (S)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00 (R)
<i>Candida albicans</i>	R	29 (S)	/	00 (R)	00(R)	09 (S)	11 (S)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	R	30 (S)	/	00 (R)	00 (R)	00 (R)	28 (S)

R : croissance microbiennes (Résistant) ; S : pas de croissance microbiennes (Sensible).

L'extrait tannique à différentes concentrations a montré une faible activité vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* avec un diamètre de zone d'inhibition de 11 mm aux concentrations de 10 et 30 mg/ml. Une faible activité envers les trois souches bactériennes *E-coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica ssp* a également été observée. Cependant, l'extrait tannique a montré une activité importante vers la souche fongique *Aspergillus brasiliensis* avec un diamètre important allons jusqu'à 28 mm a une concentration de 30 mg/ml

par rapport au contrôle positif (Nystatine) et au contrôle négatif (DMSO). De plus, une absence d'activité envers la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* a été observée.

Les résultats montrent une faible efficacité des extraits des graines de *P. pinea* L. sur les souches bactériennes testées. Cependant, l'absence de zones d'inhibition ne signifie pas nécessairement l'inactivité de l'échantillon, parfois certains produits diffusent plus lentement dans le milieu de culture (**Bensizerara et al., 2013**).

Selon **Djahra et al. (2013)** les tanins ont été rapportées comme bactériostatique ou bactéricide sur plusieurs souches bactériennes. L'acide tannique peut inhiber la croissance des bactéries des aliments et des bactéries intestinales humaines.

L'extrait tannique étudié a montré une forte activité antifongique, les tannins étant des substances de la famille des polyphénols, leur activité antifongique est justifiée par les mécanismes par lesquels ces composés réagissent. En effet, ils peuvent interférer avec les biomembranes en provoquant un dysfonctionnement ou une destruction cellulaire. Il s'agit d'un mécanisme par lequel la croissance mycélienne peut être réduite ou totalement inhibée. Les flavane-3-ols et les tannins sont connus pour avoir la capacité de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbienne et l'inhibition des enzymes par adhésion aux protéines (**Daglia, 2012; Mohammadi et al., 2014**).

Certains tannins sont connus pour se lier aux protéines ; ils pourraient donc probablement induire une modification de la perméabilité membranaire et permettre ensuite l'entrée dans la cellule fongique, d'autres composés qui posséderaient une activité cytotoxique et donc antifongique (**Mansour, 2014**).

D'après le tableau ci-dessous, il y a une grande résistance des souches microbiennes *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* à différentes concentrations vis-à-vis de l'extrait de saponine. Cela pourrait être dû à plusieurs facteurs, parmi lesquels : l'extrait diffuse mal dans un milieu gélosé ou l'extrait de saponine (brutes) n'est pas actif. En comparant avec les résultats trouvés par **Athamena et al. (2010); (Wafa, 2021)**, aucune inhibition de la croissance n'est observée avec les extraits saponiques (Extrait brut, Extrait acétate d'éthyle et Extrait n-Butanal) des graines de cumin vis-à-vis de *Candida albicans*.

La résistance des souches microbiennes peut être attribuée à l'incapacité de l'agent antimicrobien de diffuser uniformément dans le milieu trypto-caséine soja. Le choix de solvant,

ainsi que les conditions d'extraction peuvent également affecter les activités biologiques médiées par ces métabolites (Sihem, 2017).

Tableau VIII : Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis-à-vis l'extrait de saponine des graines de *Pinus pinea L.* à 5, 10, 20 et 30 mg/ml.

Les souches Microbiennes	Témoins (mm)			Zone d'inhibition (mm)			
	DMSO	Nystatine	Amoxicilline	Concentrations (mg/ml)			
				5	10	20	30
<i>E-coli</i>	R	/	33 (S)	00 (R)	15 (S)	16 (S)	14 (S)
<i>Staphylococcus Aureus</i>	R	/	34 (S)	00 (R)	12 (S)	14 (S)	14 (S)
<i>Salmonella enterica ssp</i>	R	/	34 (S)	10.98	14 (S)	14 (S)	16 (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	/	36 (S)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00 (R)
<i>Candida albicans</i>	R	29 (S)	/	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00 (R)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	R	30 (S)	/	00 (R)	00 (R)	20 (S)	00 (R)

R : croissance microbiennes (Résistant) ; S : pas de croissance microbiennes (Sensible).

Des zones d'inhibition important de l'extrait de saponine ont été observées contre l'*Aspergillus brasiliensis* avec une zone d'inhibition de 20 mm à une concentration de 20 mg/ml. Par ailleurs, des zones d'inhibition moins importantes ont été observées contre deux

souches bactériennes Gram⁺ (*E. coli*, *staphylococcus aureus*) et une souche Gram⁻ (*Salmonella ssp*), les zones d'inhibition étaient compris entre 10 mm - 16 mm de diamètre.

L'hypersensibilité de la souche *S. aureus* peut être probablement due à la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels grâce à l'absence de la membrane externe (Dumitrescu et al., 2010; Grohs, 2009). La grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux bactéries Gram (-) a déjà été observée dans plusieurs études précédentes (Georgantelis et al., 2007; Sadou et al., 2015), ceci s'explique par la complexité de la membrane cellulaire des bactéries Gram (-) qui possèdent une couche supplémentaire par rapport aux bactéries Gram (+).

La membrane externe des bactéries Gram-négatives est constituée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules, ce qui peut constituer une barrière aux agents chimiques. Néanmoins, la présence de porines au sein de cette couche permet la diffusion libre de molécules dont la masse moléculaire relative est inférieure à 600 Da (Georgantelis et al., 2007).

Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par Maatalah et al. (2012) pour l'extrait de *Tirmania pinoyi*, qui a montré une activité inhibitrice sur *S. aureus* (16 mm) et *Salmonelle* (11.6 mm), d'autre part ils ont signalés la sensibilité d'*E. coli*. Sparg et al. (2004) ont rapportés que les saponines 5-spirostan-3-ol ont montré une activité antimicrobienne, aussi bien sur des organes procaryotes qu'eucaryotes, mais seulement à de faibles densités cellulaires. En outre, l'activité antimicrobienne des saponines triterpénoïdes, Nudicaucins A, B et C et saponine guaiacin D isolées d'*Hedyotis nudicaulis* (*Rubiaceae*) évaluée contre *Bacillus subtilis* a été rapportée comme étant que faible (Amzal, 2010).

La souche de levure *Candida albicans* s'est avérée résistante à l'extrait de saponine avec un diamètre d'inhibition de 00 mm. Ceci peut être expliqué soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes, soit les molécules de saponines ne sont pas assez suffisantes en nombre, car la cellule de cette levure est un peu plus volumineuse et soit par la faible capacité des composés antimicrobiens présents dans l'extrait à diffuser efficacement dans le milieu trypto-caséine-soja (TCS ; milieu 11) (Beddou, 2015). En revanche, *Aspergillus brasiliensis* s'est révélé sensible à l'activité antifongique de l'extrait de saponine avec une zone d'inhibition de 20 mm à une concentration de 20 mg/ml.

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir antimicrobien des extraits n'est pas le même, sachant que les mêmes concentrations d'extrait a été appliquées pour les six souches

microbiennes. On constate que l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce microbienne, la concentration et également la nature de produit testé.

Le contrôle négatif (DMSO) n'a exercé aucune activité inhibitrice, les colonies se développent normalement en présence de DMSO, donc c'est un bon diluant pour notre extraits (tanin et saponine).

Les résultats ont montré que les extraits des graines *Pinus pinea L.* ont des propriétés antifongiques bien plus que des propriétés antibactériennes.

III. Evaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits

L'activité anti-hémolytique des deux extraits a été évaluée en provoquant l'hémolyse par des solutions salines avec des concentrations croissantes en NaCl et de chaleur qui induisent la désorganisation de la membrane et la libération de l'hémoglobine donnant au surnageant une coloration rouge en fonction de la proportion d'hémolyse.

III.1. Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress osmotique

Un milieu hypotonique est un milieu dans lequel la pression est inférieure à la pression intracellulaire ; ce déséquilibre induit une diffusion de l'eau vers l'intérieur de la cellule (milieu hypertonique) à travers la membrane.

L'entrée massive d'eau dans la cellule hématopoïétique provoque son gonflement et son éclatement, libérant son contenu cytoplasmique, notamment de l'hémoglobine, ce qui constitue le phénomène d'hémolyse. Ce dernier est observé à des concentrations de NaCl inférieures ou égales à 0,9 %.

L'influence des extraits de tannins et de saponines des graines de *P. pinea L.* sur la lyse osmotique des hématies est déterminée en mesurant l'inhibition de l'hémolyse à des concentrations croissantes de solutions salines. Les résultats obtenus dans cette partie sont présentés dans les figures 23 et 24, exprimant le pourcentage de protection vis-à-vis de l'hémolyse induite par hypotonie en fonction des concentrations des extraits.

Nous notons une croissance proportionnelle entre la concentration des extraits et le pourcentage de protection pour toutes les concentrations salines utilisées. Le pourcentage de protection contre de l'hémolyse des deux extraits a varié avec la concentration dans une gamme de 28,52 à 66,72 %.

L'effet protecteur maximal des extraits est enregistré à une concentration de 1 mg/ml. Dans le cas des saponines, ces derniers ont présenté un pourcentage de protection de $66,72 \pm 0,415 \%$, $64,71 \pm 1,344 \%$ et $61,35 \pm 1,028 \%$ pour des concentrations en NaCl de 0,5%, 0,7% et 0,9%, respectivement. L'effet protecteur maximal des tannins étaient respectivement de $60,35 \pm 0,711 \%$, $61,91 \pm 1,107 \%$ et $54,42 \pm 0,553 \%$ pour des concentrations en NaCl de 0,5%, 0,7% et 0,9%. Ces données indiquent un effet protecteur relativement important des extraits contre l'hémolyse induite par des solutions salines à des concentrations de 0,5% et 0,7% en NaCl.

En comparant nos résultats avec l'acide salicylique, ce dernier a montré un pourcentage de protection plus élevé contre l'hémolyse induite par des solutions salines de 0,5 % et 0,7 de NaCl ($88,366 \pm 0,158 \%$ et $83,445 \pm 0,533 \%$, respectivement) et un pourcentage de protection plus faible par rapport aux saponines à une solution saline de 0,9 % de NaCl ($53,02 \pm 0,316 \%$). Cependant, des résultats proches ont été observés pour les tanins et l'acide salicylique à une solution saline de 0,9 % de NaCl.

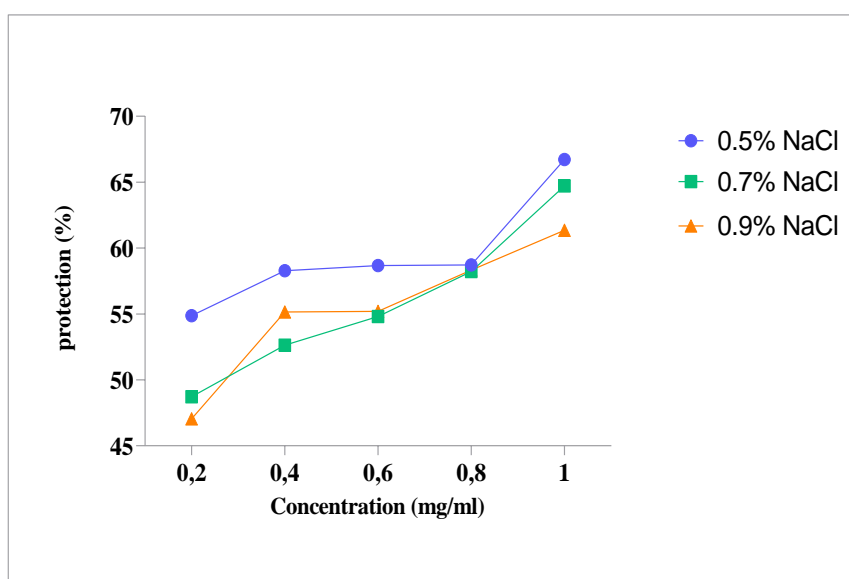


Figure 23 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations de l'extrait de saponine des graines de *Pinus pinea L.*

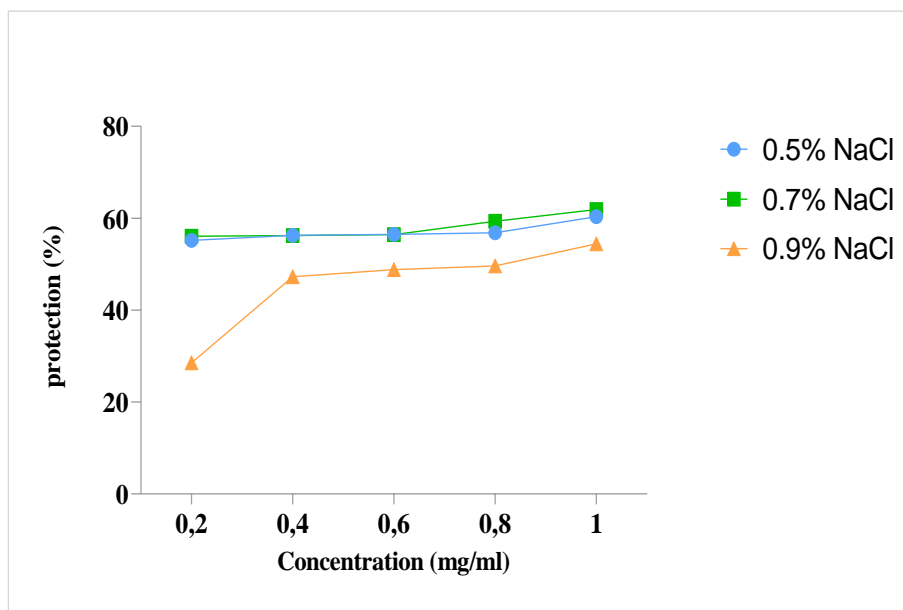


Figure 24 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations de l'extrait tannique des graines de *Pinus pinea* L.

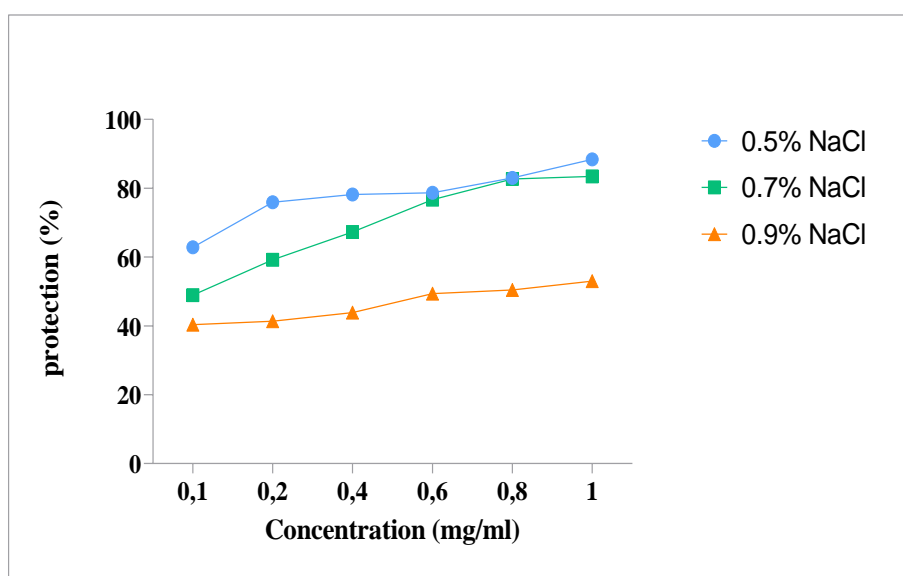


Figure 25 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations de l'acide salicylique.

Dans cette étude, il a été constaté que l'inhibition de l'hémolyse augmentait avec l'augmentation de la concentration des extraits et le contraire avec l'augmentation du NaCl dans la plupart des cas ; tannin, saponine et acide salicylique. Ces résultats sont comparables à ceux enregistrés par **Moualek et al. (2016)** sur l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo*, avec des

pourcentages de protection qui sont respectivement de 46,15, 79,53, 70,78, 71,95 et 76,46 % aux concentrations de 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 et 0,9 % de NaCl.

L'exposition des érythrocytes aux substances nocives, comme un milieu hypotonique, entraîne une lyse de la membrane accompagnée d'une hémolyse et d'une oxydation de l'hémoglobine ; dans un milieu isotonique, les hématies tentent de maintenir un équilibre entre la concentration ionique du milieu extracellulaire et celle du milieu intracellulaire. Dans une solution hypotonique, l'afflux d'eau est supérieur que la fuite ainsi, l'eau pénètre dans l'hématie (selon son gradient de concentration), qui gonfle et devient sphérique. La membrane cellulaire est relativement inélastique et ne se rompt qu'après une très légère augmentation de volume, l'hématie subit ainsi l'hémolyse, qui provoque l'ouverture des pores membranaires dénommés pores d'hémolyse, laissant la membrane cellulaire vide (**RAHMANI et al., 2016**).

La capacité anti-hémolytique des extraits peut être attribuée à leur activité antioxydante. Cette efficacité est attribuée au fait que les globules rouges sont les principales cibles des radicaux libres, en raison de leur richesse en acides gras polyinsaturés (acide linoléique, acides arachidoniques en particulier). De plus, les globules rouges sont particulièrement exposés aux dommages oxydatifs endogènes en raison de leur rôle spécifique de transporteur d'oxygène (**Paiva-Martins et al., 2014; Paiva-Martins et al., 2009**) et du transport de l'O₂ qui est lié à l'hémoglobine (**Samir and Benasam, 2018**). Lorsque les antioxydants sont consommés, les radicaux libres vont agir sur les parois des érythrocytes, provoquant leur éclatement. S'il existe des composés ayant une activité antioxydante dans l'environnement, l'hémolyse sera logiquement retardée (**Arbos et al., 2008**).

La présence d'une substance antioxydante dans le milieu va retarder le phénomène d'hémolyse en protégeant les érythrocytes contre l'agression des radicaux libres. Il existe plusieurs antioxydants tels que la vitamine E, la vitamine C et les flavonoïdes qui inhibent l'hémolyse (**Tabart et al., 2009**).

D'après **da Silva et al. (2002)**, une saponine stéroïdienne isolée d'*Agave attenuata* a inhibé l'augmentation de la perméabilité vasculaire causée par l'acide acétique et elle n'a pas été accompagnée par un effet hémolytique indésirable contrairement aux (**Ahn et al., 1998; Estrada et al., 2000; Mølgaard et al., 2000; Sindambiwe et al., 1998; Wink et al., 2001**), qui ont rapportés que les saponines avaient la capacité de lyser les érythrocytes.

Il a été démontré que l'incorporation des composés phénoliques, notamment de tannins (propriété de précipitation des protéines) et de flavonoïdes dans la membrane érythrocytaires

améliorent la stabilité de cette dernière contre la lyse hypotonique. Cette propriété peut s'expliquer par l'augmentation du rapport volume/surface cellulaires qui pourrait être obtenue soit par une expansion de la membrane, soit par une rétraction cellulaire. Les polyphénols possèdent de nombreux effets biologiques, principalement attribués à leur effets antioxydants, notamment l'inhibition de la peroxydation et chélation des métaux de transition par des flavonoïdes et des glycosides (Ebrahimzadeh et al., 2010; Rabiei et al., 2012).

De plus, la déformation et le volume cellulaire des érythrocytes sont étroitement liés au contenu intracellulaire en calcium. Par conséquent, on peut suggérer que l'effet protecteur des extraits serait dû à leur capacité à modifier l'influx de calcium dans les érythrocytes (Chopade et al., 2012).

III.2. Effet protecteur des extraits vis-à-vis d'un stress thermique

L'effet stabilisant des extraits des graines de *Pinus pinea* L. étudiée face à la lyse érythrocytaire induite par la chaleur est illustré dans la figure 26. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection par rapport à la concentration des extraits étudiés et comparés au standard (Acide salicylique).

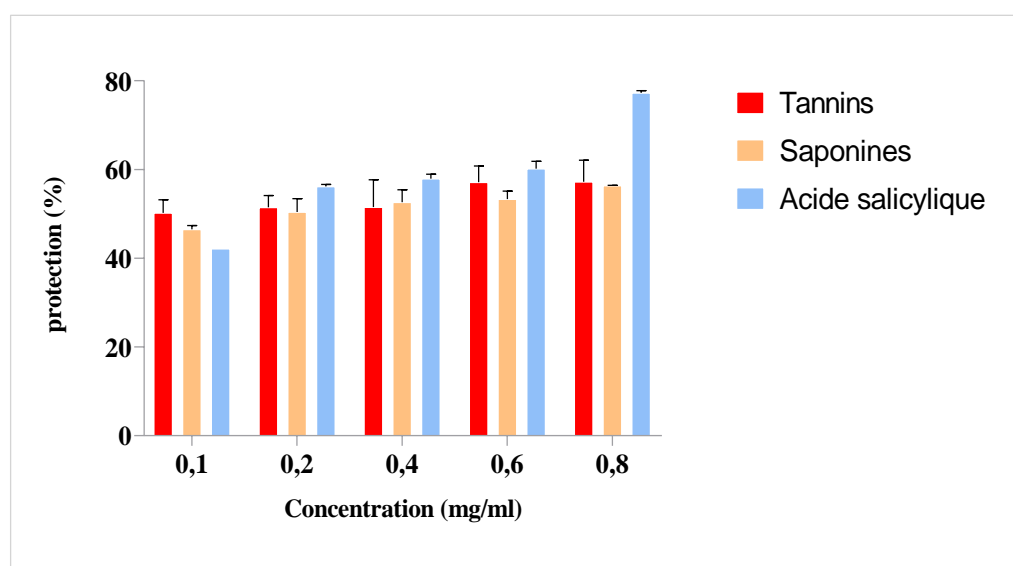


Figure 26 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis de la lyse induite par un stress thermique en fonction des différentes concentrations d'acide salicylique et des extraits.

Pour des concentrations allant de 0,1 à 0,8 mg/ml les extraits ont montré une activité anti-hémolytique avec des pourcentages de protection allant de (46,49 à 57,21 %). Ces données sont nettement très proches à celle de l'acide salicylique (42,16 à 77,27 %).

D'après **Gershfeld and Murayama (1988)**, les érythrocytes exposés à des températures relativement élevées se déforment progressivement pour devenir sphériques. Ainsi, la perturbation de leurs membranes diminue leur capacité à résister à l'hémolyse. L'effet protecteur contre la lyse érythrocytaire induite par la chaleur peut être expliqué par l'interaction des extraits avec les protéines membranaires, inhibant ainsi leur dénaturation (**Lepock et al., 1989**).

Par ailleurs, L'activité anti-hémolytique exercée par l'extrait de tanins des graines de *Pinus pinea L.* est probablement liée à leur propriété partagée avec les polyphénols (précipitation des protéines). Certaines polyphénols se fixent sur les protéines membranaires en induisant un changement de leur conformation (**Leong et al., 2014**), et d'autres se lient à la PLA2 par des interactions hydrophobes avec trois acides aminés de site actif de l'enzyme (**da Silva Nunes et al., 2011**).

Sowndhararajan et al. (2011), ont montré que dans le modèle d'hémolyse *in vitro*, les composés phénoliques présents dans la suspension érythrocytaire peuvent bloquer la chaîne de propagation des radicaux peroxydes dans la phase aqueuse en piégeant ces radicaux avant qu'ils attaquent les lipides de la membrane érythrocytaire, et ce faisant, ils vont arrêter et inhiber ou retarder l'hémolyse. Ainsi, plusieurs études ont suggéré que les polyphénols retardent la solubilisation et inhibent l'oxydation de la trame lipidique et protègent les cellules, non seulement en piégeant les radicaux libres, mais aussi en modifiant les propriétés de la membrane cellulaire (**Singh and Rajini, 2008; Suwalsky et al., 2007**).

Selon **Francis et al. (2002a); (Patra and Saxena, 2009)** les saponines monodesmosidiques (avec une seule chaîne glucidique) peuvent plonger dans la biomembrane avec leur chaîne lipophile complexant le cholestérol, alors que leur chaîne glucidique hydrophile se lie aux glycoprotéines et aux glycolipides extracellulaires, ce qui en résulte une perturbation de la fluidité et la perméabilité des biomembranes contrairement aux saponines bidesmosidiques (avec deux chaînes glucidiques) ne peuvent pas interagir de la même manière avec la biomembrane. Cela suggère que l'hémolyse est en relation avec la structure des saponines.

D'après (**Voutquenne-Nazabadioko et al., 2013**); **Woldemichael and Wink (2001)** les saponines monodesmosidiques sont plus actives sur la membrane cellulaire que les saponines bidesmosidiques. L'extrait saponique est donc probablement, riche en saponines monodesmosidiques.

Selon **Sangeetha and Vidhya (2016)**, l'activité anti-hémolytique des extraits végétaux est probablement due à leur effet inhibiteur sur les enzymes impliquées dans la production des médiateurs chimiques de l'inflammation ainsi que sur le métabolisme de l'acide arachidonique.

IV. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

L'activité antioxydante des extraits de saponines et de tannins des graines de *Pinus pinea* L. a été étudiée en évaluant leur pouvoir réducteur et leur capacité antiradicalaire en utilisant des tests FRAP et ABTS, respectivement.

IV.1. Test de piégeage du radical ABTS⁺

Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) pour former le radical cationique ABTS⁺ de coloration bleu-vert. L'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical ABTS⁺ en ABTS. L'activité antioxydante est déterminée par la décoloration de la solution et s'exprime par le pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde à laquelle le radical ABTS⁺ présente une bande d'absorbance caractéristique (**Moon and Shibamoto, 2009; Osman et al., 2006**).

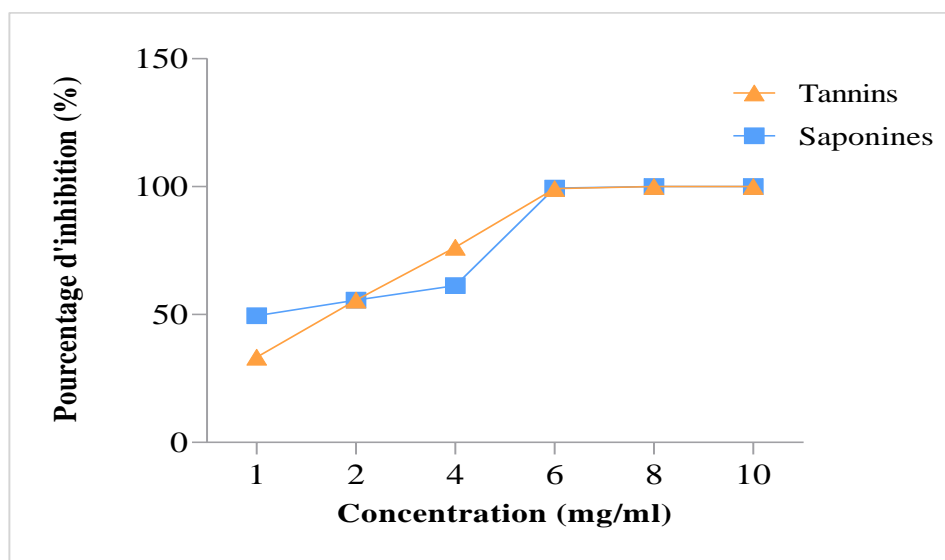


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ par les extraits de saponines et de tannins des graines de *Pinus pinea* L.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire obtenus pour les extraits, l'acide ascorbique, BHA et BHT sont présentés dans les figures 27, 29 et 30.

Le radical $ABTS^+$ a été inhibé de façon importante à toutes les concentrations testées. À la plus faible concentration (1 mg/ml), l'extrait de saponines a inhibé $49,55 \pm 0,091$ % du radical $ABTS^+$ et $33,31 \pm 0,091$ % pour celui de l'extrait tannique. Tandis qu'à des concentrations allant de 6 à 10 mg/ml, les deux extraits des graines de *Pinus pinea L.* ont présenté un pourcentage d'inhibition totale de 100 %. D'autre part, le BHA, le BHT et l'acide ascorbique ont montré un PI de 100 % à des concentrations de 0,8 et 0,08 mg/ml, respectivement.

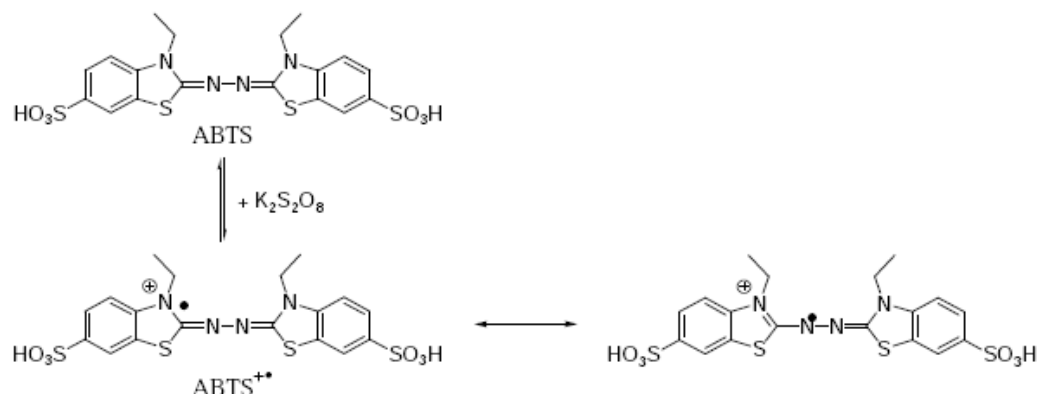


Figure 28 : Formation du radical cation $ABTS^+$ à partir de l'ABTS.

Les concentrations qui inhibent 50 % du radical $ABTS^+$ (IC_{50}) sont représentées dans le **tableau IX**.

Tableau IX : les valeurs des IC_{50} (mg/ml) des extraits des graines de *Pinus pinea L.* et des antioxydants synthétiques.

	Tannins	Saponines	Acide ascorbique	BHT	BHA
IC_{50} (mg/ml)	1,747	1,074	0,056	0,1	0,081

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir de la IC_{50} , qui est la concentration nécessaire pour réduire 50 % des radicaux. Plus la valeur de la IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (**Locatelli et al., 2009**). L'extrait tannique et l'extrait de saponines ont présentés des capacités importantes de neutralisation des radicaux libres, avec des IC_{50} de 1,75 et de 1,07 mg/ml, respectivement. En comparant la capacité antioxydante de nos extraits avec celle de l'acide ascorbique (0,06 mg/ml), du BHT

(0,1 mg/ml) et du BHA (0,08 mg/ml), nous constatons que l'activité des extraits a piégés le radical $ABTS^+$ est bien inférieur à celle des antioxydants synthétiques.

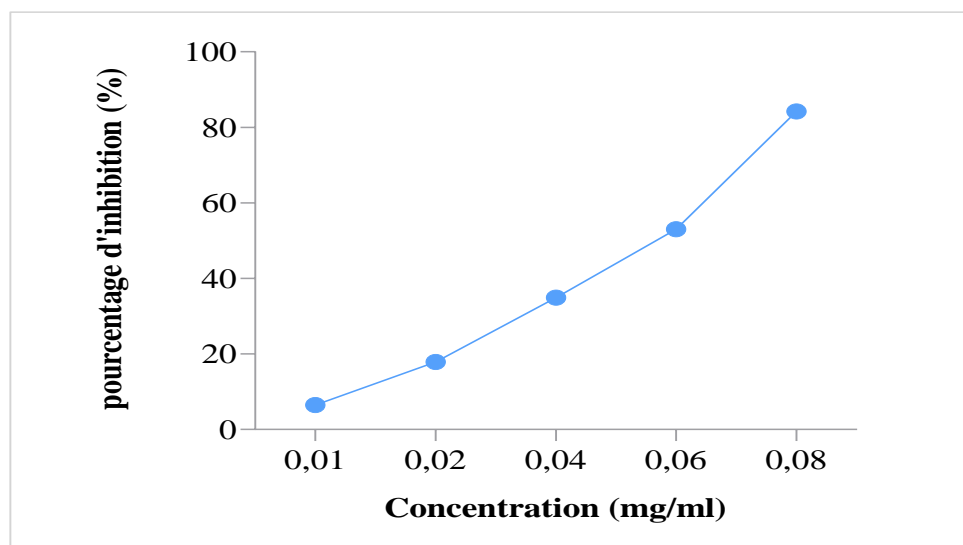


Figure 29 : Pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^+$ de l'acide ascorbique.

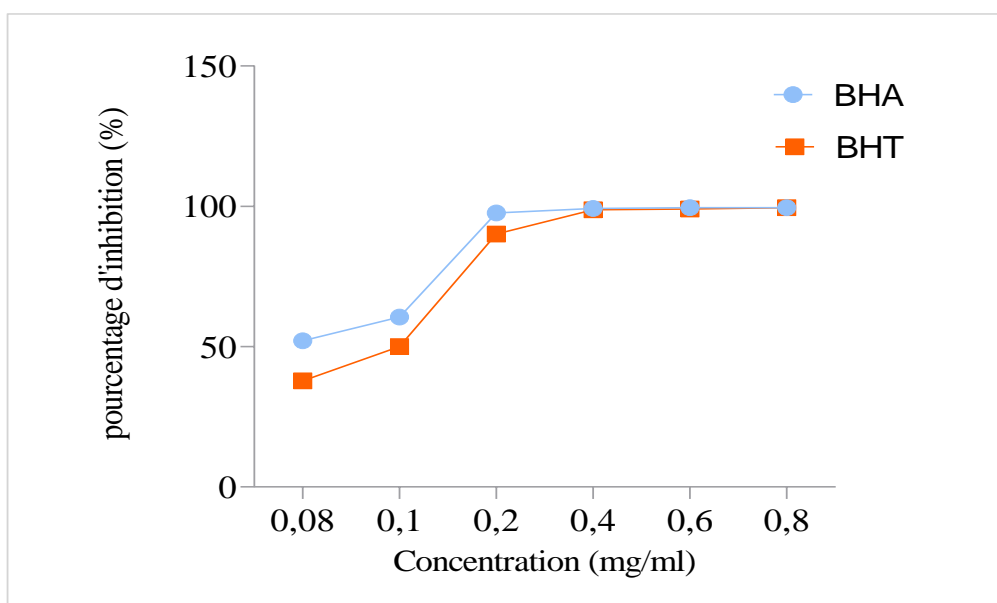


Figure 30 : Pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^+$ du BHT et BHA.

Selon l'étude de **Huong et al. (1998)**, les résultats ont montré que les saponines du ginseng vietnamien (*Panax vietnamensis*) ont une action protectrice aux doses de 0,05-0,5 mg/ml contre les radicaux libres *in vivo* et *in vitro*. Cependant, l'activité a été attribuée aux composants mineurs tels que l'alpha-hédérine, l'hederasaponin-C et les hederacolchisides-E et F (**Gülçin et al., 2004**).

Selon **Liang et al. (2020)**, les tannins ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur des protons et accepteur des radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation, comme les procyanidines (**Luo et al., 2018**). Des travaux similaires ont confirmé que Les tannins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois efficaces que les phénols simples (**Peronny, 2005**).

Ceci est en accord avec d'autres études menées sur d'autres plantes médicinales dont les travaux de **Behegaoui et al. (2019)** réalisés sur des extraits de *Nigella Sativa L.* qui ont mis en évidence une forte activité antioxydante de l'extrait alcoolique et de l'huile essentielle des gaines de *Nigella*. Ces mêmes études ont montré que *Nigella Sativa L.*, est une espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques dont l'activité antioxydante (**Talbi et al., 2014; Talbi et al., 2015**).

IV.2. Test de pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits des graines de *Pinus pinea L.* est mesuré en suivant la réduction directe de fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure ($Fe^{3+}(CN)_6$) en fer ferreux (Fe^{2+}) dans un milieu acidifié par TCA et qui est déterminée par la détection spectrophotométrique de complexe $(Fe^{3+})_4[Fe^{2+}(CN)_6]_3$ ayant une forte absorption à 700 nm (**Boukhemkhem et al., 2019**). Cette réaction se traduit par un changement de couleur du ferricyanure de potassium du jaune au bleu-vert avec une augmentation de l'absorbance, ce qui indique l'augmentation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés (**Zou et al., 2004**).

Les résultats du pouvoir réducteur obtenus pour les extraits de pignons, l'acide ascorbique, le BHA et le BHT sont représentés dans les figures 31, 32 et 33.

D'après les résultats, il est observé que le pouvoir réducteur des extraits et des antioxydants synthétiques était proportionnel à la concentration.

Les extraits de saponines et de tanins, à une concentration de 10 mg/ml, ont présenté une absorbance de $1,265 \pm 0,014$ et $0,896 \pm 0,0014$, respectivement. En comparant ces résultats avec ceux des antioxydants synthétiques, le BHA et le BHT ont présenté une absorbance égale à $2,490 \pm 0,111$ et $0,57 \pm 0,015$, respectivement, à une concentration de 0,8 mg/ml, tandis que l'acide ascorbique a présenté une absorbance de $0,386 \pm 0,002$ à une concentration de 0,1 mg/ml. Les résultats indiquent que le pouvoir réducteur des extraits des graines de *P. pinea L.* est très inférieur à celui des antioxydants synthétiques.

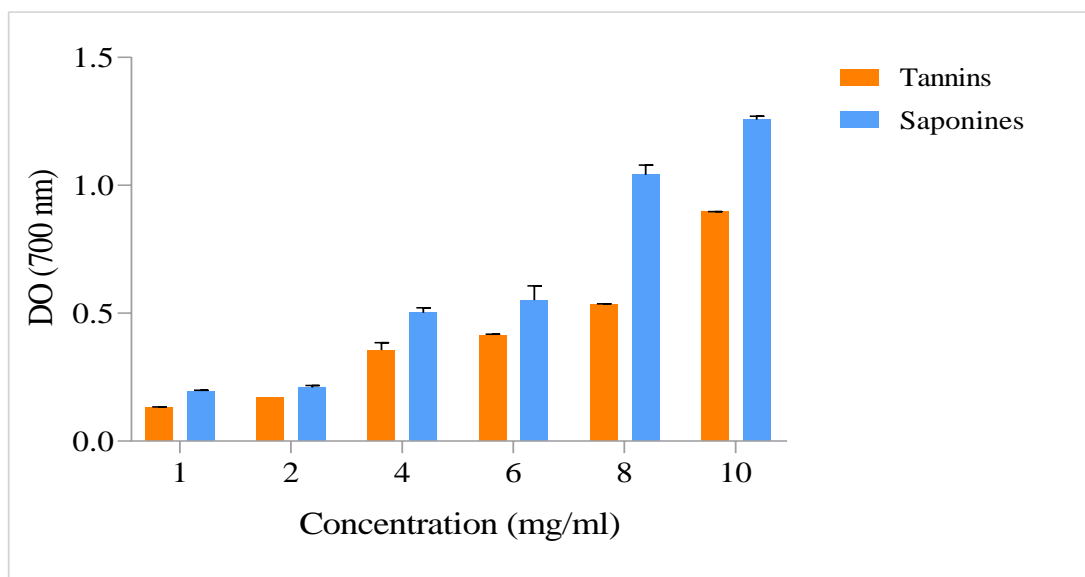


Figure 31 : Variation des absorbances du pouvoir réducteur des tannins et saponines à différentes concentrations.

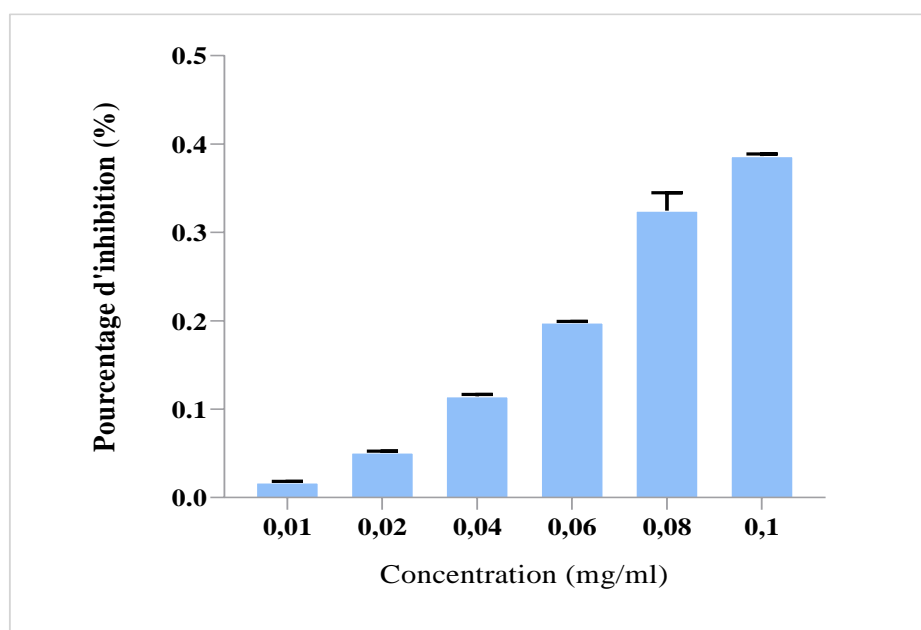


Figure 32 : Variation des absorbances du pouvoir réducteur de l'acide ascorbique à différentes concentrations.

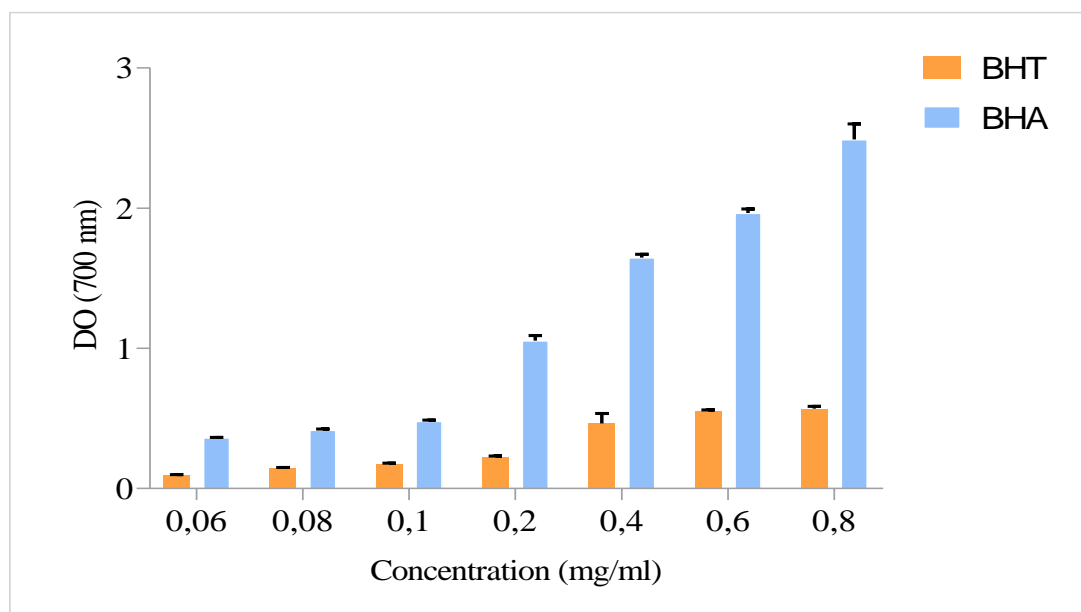


Figure 33 : Variation des absorbances du pouvoir réducteur du BHA et BHT à différentes concentrations.

Des études similaires sur le pouvoir réducteur ont été réalisées sur les extraits aqueux et les huiles essentielles de la plante de *P. halepensis* Mill. Les auteurs ont rapporté que le pouvoir réducteur des extraits était principalement dû à la composition chimique des extraits, qui était riche en composés phénoliques. Ces composés, grâce à leurs propriétés redox, agissent en tant qu'agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et d'oxygène singulier afin de neutraliser les ERO (Djerrad et al., 2015).

La différence entre les extraits de saponine et de tanin peut être interprétée par la présence des molécules polaires telles que les composés phénoliques hydroxylés ou les molécules glycosylées, ainsi que la teneur en ces composés (Keeragalaarachchi et al., 2016; Siddhuraju and Manian, 2007; Soobrattee et al., 2005). Généralement, les propriétés réductrices sont associées à la présence des composés qui exercent leur action en brisant la chaîne des radicaux libres par un intermédiaire pour donner un atome d'hydrogène et les convertit en produits plus stables (Chahmi et al., 2015).

Kumarappan et al. (2012a), ont rapporté que l'activité antioxydante des composés naturels peut avoir une corrélation réciproque avec leur pouvoir réducteur du fer (Guettaf et al., 2016; Kumarappan et al., 2012b). De plus, de nombreux auteurs considèrent le pouvoir réducteur des extraits comme un indicateur significatif de son pouvoir antioxydant potentiel (Li et al., 2001; Liu et al., 2013a; Liu et al., 2013b).

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

L'étude a été menée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits des graines entières de *Pinus pinea* L. Les expériences ont été réalisées sur le modèle d'œdème de la patte de souris, induit par 0,1% de carragénine. Les extraits de tanins et de saponines ont été testés à une dose de 10mg/kg, administrée par gavage (voie orale). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux du médicament Diclofénac, qui est un anti-inflammatoire non stéroïdien, et du contrôle physiologique.

Le développement des œdèmes induit par la carragénine sur les différents groupes testés a été observé et pesé sur une balance analytique. Les différents résultats obtenus sont représentés dans le **tableau X** et mettant en valeurs le poids moyen des pattes gauches et droites et les pourcentages de réduction de l'œdème.

Tableau X : L'effet des extraits de saponines et tanins des graines complètes de *Pinus pinea* L. et du Diclofénac sur l'œdème de la patte induit par la carragénine.

Lots	Md (Moy en d ± Et)	Mg (Moy en g ± Et)	% d'œdème	% de réduction d'œdème
Saponines (10mg/kg)	0,1496 ± 0,019	0,1932 ± 0,029	29,14	75,65 ± 0,562
Tannins (10mg/kg)	0,1374 ± 0,014	0,1782 ± 0,012	29,69	75,19 ± 2,503
Témoin	0,1243 ± 0,012	0,273 ± 0,258	100	/
Référence (Diclofénac) (0,5 mg/kg)	0,1391 ± 0,012	0,1608 ± 0,01	15,56	86,99 ± 1,674

Md : moyenne des pattes gauches

Mg : moyenne des pattes droites

En examinant les résultats, on constate une augmentation du poids de l'œdème après injection de carragénine. L'injection de cette substance provoque une inflammation locale causée par une lésion tissulaire, cette lésion tissulaire induit la synthèse de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire tels que l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes, le PAF (facteur d'activation plaquettaire), les cytokines, le NO (monoxyde d'azote) et le TNF (facteur de nécrose tumorale) (**Dellai et al., 2013**). L'induction de l'œdème par la carragénine est considéré comme un signe caractéristique de

l'inflammation et un paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés (Morris, 2003).

Les souris du groupe témoin ont développé un œdème de la patte de 100% (Tableau X). Dans le groupe de souris traitées avec l'extrait de saponine (10 mg/kg), on observe une réduction de l'œdème de la patte par rapport à celui du groupe témoin, l'œdème a été réduit de 100% à 29,14%, ce qui correspond à un pourcentage de réduction de l'œdème de $75,65 \pm 0,562$ %. D'autre part, l'extrait de tanin (10 mg/kg) a montré un pourcentage de réduction de l'œdème proche de celui des saponines ($75,19 \pm 2,503$ %). En comparant aux souris du groupe contrôle négatif, L'administration du Diclofénac (0,5 mg/kg) a entraîné une diminution du développement de l'œdème, avec un pourcentage de réduction de l'œdème de $86,99 \pm 1,674$ %.

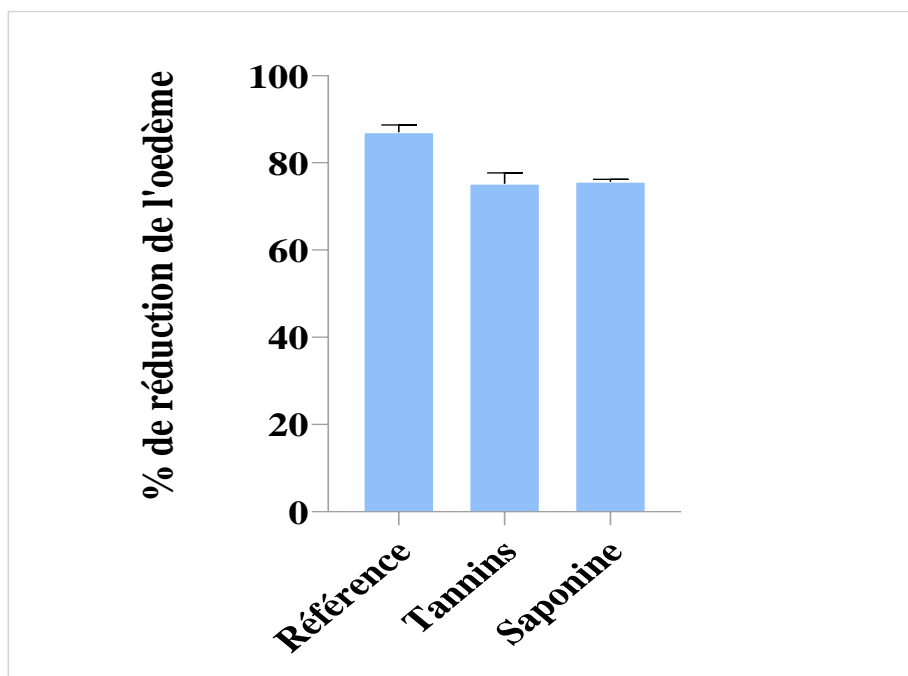


Figure 34 : Pourcentage de réduction de l'œdème par les extraits des grains de *Pinus pinea* L. et le Diclofénac 75mg.

Les résultats ont montré que les extraits des graines de *P. pinea* L. à une concentration de 10 mg/kg présentait une activité anti-inflammatoire importante. De plus, l'activité des extraits, comparée à celle du Diclofénac, était proche. Ce qui suggère que les extraits de tannins et de saponines de pignons de pin possèdent un pouvoir anti-inflammatoire prometteur.

Alaoui et al. (1998), ont rapporté qu'à une dose de 10 mg/kg de l'extrait de saponine d'*Argania spinosa*, la diminution de l'œdème a été observée. Sachant qu'à des doses de 50 mg/kg à 100

mg/kg, l'effet anti-inflammatoire de l'extrait a été semblable à celui de l'indométacine (anti-inflammatoire non-stéroïdien) aux doses de 10 à 20 mg/kg.

Amzal (2010), ont rapporté qu'*in vivo* les saponines isolées de *Bupleurum rotundifolium* L. ont montré une activité anti-inflammatoire contre l'œdème d'oreille induit par 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) et l'inflammation chronique de la peau. L'activité anti-inflammatoire des saponines isolée a été suggérée comme étant liée à leur structure chimique.

L'activité anti-inflammatoire exercée par les extraits des graines de *P. pinea* L. pourrait s'interpréter par l'inhibition de la synthèse des substances pro-inflammatoires. Cette inhibition pourrait être due à la présence de composants actifs ayant un pouvoir anti-inflammatoire. Ces composés peuvent exercer leurs propriétés anti-inflammatoires à de multiples niveaux, à travers la modulation des voies de signalisation des MAPK (Mitogen activated protein kinases (**Chen et al., 2000; Guo et al., 2009**), des protéines kinases B, des facteurs de transcription AP-1 et NF-Kb (Nuclear factor kB) (**Manna et al., 2000; Romier et al., 2008**), l'inhibition de la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires, la suppression de l'activité des iNOS (nitricoxidesynthase) et des cyclooxygénases (COX) (**Donnelly et al., 2004; O'Leary et al., 2004**), et en diminuant la production de ROS/RNOS (Reactive oxygen species/Reactive nitrogen species) et de COX qui ont un rôle crucial dans l'inflammation (**Ichikawa et al., 2006; Mourão, 2013**).

Conclusion et perspective

Les plantes médicinales de la nature présentent une source indéfinie des molécules bioactives, ces molécules résultant des métabolites secondaires produits à partir de métabolisme des nutriments, que sont très utilisées par l'homme dans les domaines médicaux. Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle et du développement de phytomédicaments. C'est dans ce contexte que notre étude porte sur la valorisation des activités biologiques d'une espèce de *Pinus* Linné : *Pinus pinea* sur les activités antioxydante, antimicrobienne, anti hémolytique *in vitro* et l'activité anti-inflammatoire *in vivo*.

L'extraction des composés bioactifs de plante genre *Pinus* par ultrason et éthanol a fourni un rendement très important en l'extrait brut : saponine (12,59 %) et tanin (8,87 %).

Les deux extraits aqueux de *Pinus pinea* L. exercé des effets antimicrobiens important vis-à-vis plusieurs souches, à savoir : quatre souches bactériennes et deux souches fongiques. Les résultats de l'activité antifongique montrent que *Aspergillus brasiliensis* très sensible aux deux extrait saponine et tanin avec des zone d'inhibition de 20 mm et 28 mm respectivement.

L'extrait saponique montré une activité antibactérienne contre deux souches bactériennes Gram ⁺ (*E. coli*, *staphylococcus aureus*) et une souche Gram ⁻ (*Salmonella ssp*), les zones d'inhibition étaient compris entre 14 mm - 16 mm de diamètre. Concernant l'extrait hydroalcoolique s'est révélé actif envers cinq souches microbiennes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica ssp*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*).

Néanmoins, l'effet inhibiteur observé sur *Escherichia coli* serait d'un grand intérêt car cette espèce est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques et extraits de plantes.

L'évaluation d'activité anti-hémolytique *in vitro* par évaluation de la stabilité des membranes des globules rouges a permis de montrer que ces deux métabolites ont la capacité de protéger les membranes des érythrocytes contre un choc hypotonique suivi d'un choc thermique, en raison de la ressemblance de la membrane de lysosome avec celle du globule rouge. Les extraits des tanins et saponines ont montré un effet protecteur très important contre l'hémolyse induite par des solutions salines avec des pourcentages de protection de $66,72 \pm 0,415$ % à 0,5 % NaCl et $61,91 \pm 1,107$ % à 0,7 % NaCl, respectivement et des pourcentages de protection allant de (46,49 à 57,21 %) vis-à-vis stress thermique.

Le potentiel anti-radicalaire a été déterminé par deux méthodes FRAP et ABTS, qui montre que les deux métabolites secondaires présentent des propriétés antioxydantes a

concentration-dépendantes considérables. Les résultats montrent une capacité très importante de neutralisation de radical ABTS⁺ avec un pourcentage d'inhibition totale (100 %).

L'effet anti-inflammatoire *in vivo* des deux extraits hydroalcoolique et saponique de *Pinus pinea* L. montre la capacité de diminuer le volume de la patte de la souris induite par la carragénine avec des pourcentages de réduction de l'œdème très élevés et très proches, saponine $75,65 \pm 0,562$ % et tanin $75,19 \pm 2,503$ % par rapport à une concentration de 100 mg/ml, les résultats obtenus confirment que les deux extraits présentent un fort pouvoir anti-inflammatoire.

Globalement, la plante sélectionnée dans ce travail contient des molécules bioactives très intéressantes qui peuvent être purifiées et employées pour d'autres applications thérapeutiques.

Ces résultats restent préliminaires, il serait intéressant de faire des études complémentaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets.

Ces études doivent être aussi orientées vers :

- Elargissement du domaine d'études *-in vitro-* et *-in vivo-* tels que les activités enzymatiques...
- La purification des principes actifs majoritaires de *Pinus pinea* L impliqués dans l'activité anti-inflammatoire et utiliser d'autres concentrations pour les tests *in vivo* et procéder à l'étude histologique.
- Identification qualitatives et quantitatives des saponines les plus bioactives et une meilleure caractérisation par HPLC pour identifier les différents types de saponines responsables de l'activité hémolytique.
- Évaluation des effets des composés actifs de cette plante sur les signalisations impliquées dans le processus antimicrobien.
- Une optimisation de l'extraction de ces molécules.
- L'identification qualitative et quantitative des composés phénoliques présents dans cette plante par des techniques analytiques plus performantes telles que la HPLC et la Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.
- Exploitation des saponines et des tannins en biotechnologie (industrie pharmaceutique, agro-alimentaire et cosmétique).
- Utilisation agricole dans la lutte contre les agents pathogènes.

Références bibliographiques

- Aberrane S and Mehalla M (2019) Etude de l'activité anti-inflammatoire et antihémolytique de l'extrait aqueux de feuilles de Malva sylvestris L, Université Mouloud Mammeri.
- Abid MF, Zablouk MA and Abid-Alameer AM (2012) Experimental study of dye removal from industrial wastewater by membrane technologies of reverse osmosis and nanofiltration. *Iranian journal of environmental health science & engineering* 9:1-9.
- Adili B (2012) Croissance, fructification et régénération naturelle des peuplements artificiels de Pin pignon (*Pinus pinea* L.) au nord de la Tunisie, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2); Université de Carthage
- Agrimi M and Ciancio O (1993) Le pin pignon (*Pinus pinea* L.).
- Ahn B-Z, Yoon Y-D, Lee YH, Kim B-H and Sok D-E (1998) Inhibitory effect of bupleuri radix saponins on adhesion of some solid tumor cells and relation to hemolytic action: screening of 232 herbal drugs for anti-cell adhesion. *Planta medica* 64:220-224.
- Ahumada A, Ortega A, Chito D and Benítez R (2016) Saponins of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): A by-product with high biological potential. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 45:438-469.
- Ajibade V and Famurewa O (2012) Histopathological and Toxicological effects of crude saponin extract from *Phyllanthus niruri*, L (Syn. *P. franternus*. Webster) on Organs in animal studies. *Global Journal of Medical Research* 12:31-37.
- Alaoui K, LAGORCE J-F, Cherrah Y, Hassar M and Amarouch H (1998) Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines d'*Argania spinosa*, in *Annales pharmaceutiques françaises* pp 220-228.
- Amri I, Gargouri S, Hamrouni L, Hanana M, Fezzani T and Jamoussi B (2012) Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of pest science* 85:199-207.
- Amri I, Hanana M, Jamoussi B and Hamrouni L (2017) Essential oils of *Pinus nigra* JF Arnold subsp. *laricio* Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. *Arabian Journal of Chemistry* 10:S3877-S3882.
- Amzal H (2010) Etude de l'activité antioxydante des saponines de l'arganier.
- André S, Lasselain M, Pareyre C, Deysson G, Chénieux J and Rideau M (1981) Study of some biological properties of dihydrofuroquinoline alkaloids isolated from Rutaceae (author's transl), in *Annales pharmaceutiques françaises* pp 255-266.

- Arbos KA, Claro LM, Borges L, Santos CA and Weffort-Santos AM (2008) Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition research* 28:457-463.
- Arrif S, Benkhaled M, Haba H and Mouffouk S (2020) Antioxidant Activity and Chemical Composition of *Helichrysum lacteum* Coss. & Dur. *The Natural Products Journal* 10:429-439.
- Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S and Khebri S (2010) Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese science journal* 11:69-81.
- AYADI M (2014) Utilisation des tanins condensés de la pulpe de caroube en alimentation des caprins du nord du Maroc: Effet sur les performances de production et la qualité nutritionnelle des produits, Rapport de thèse de Doctorat.
- Baba-Moussa F, Akpagana K and Bouchet P (1999) Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology* 66:335-338.
- Bate-Smith E (1973a) Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry* 12:907-912.
- Bate-Smith E (1973b) Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* 12:1809-1812.
- Behegaoui L, Zerzi F and Mosbah C (2019) Contribution à l'étude des substances bioactives et de l'activité antioxydante des deux extraits des graines de *Nigella sativa*.
- Beddou F (2015) Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. *Coss & Dur.*
- Beddou F, Bekhechi C, Ksouri R, Sari DC and Bekkara FA (2015) Potential assessment of *Rumex vesicarius* L. as a source of natural antioxidants and bioactive compounds. *Journal of food science and technology* 52:3549-3560.
- Belloum Z (2007) Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes, cas de l'espèce *Inula crithmoides* L.
- Bensizerara D, Menasria T, Melouka M, Cheriet L and Chenchouni H (2013) Antimicrobial Activity of Xerophytic Plant (*Cotula cinerea* Delile) Extracts Against Some Pathogenic Bacteria and Fungi. *Jordan Journal of Biological Sciences* 6.

- Bentabet N, Boucherit-Otmani Z and Boucherit K (2014) Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie* 12:364-371.
- Benyagoub E, Razni D and Moghtet S (2017) Phytochemical composition of *Anastatica hierochuntica* L., can it fight the toxigenic bacterial agents responsible for food poisoning? *Microbes and Health* 6:5-8.
- Bermúdez FL and Rognon P (1996) LES INCENDIES DE FORÊTS EN ZONE MÉDITERRANÉENNE ANALYSE DÉTAILLÉE À TRAVERS LE CAS DE L'ALGÉRIE. *Érosion hydrique, désertification et aménagement dans l'environnement méditerranéen semi-aride*:213.
- Bonnaillie C, Salacs M, Vassiliova E and Saykova I (2012) Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.).
- Boudjenna N, Benzouai S and Karouche S (2020) Criblage phytochimique des feuilles de *lavandula officinalis* récoltées de la région Constantine.
- Boukhemkhem R, Fenghour I and Lahouel AE (2019) Evaluation invitro de l'effet antioxydant des produits nouvellement synthetises a fonction thiol: Les derives du benzothiazole, Université de Jijel.
- Bourkache K (2016) Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des tanins extraits de *lavandula stochas*, UMMTO.
- BOUZAHER L (2019) Contribution à l'étude -in vitro-, des activités biologiques des saponines de *Chenopodium quinoa* Willd.
- BRUNET S PARTIE IV: Etude des interactions. *Cette thèse est dédiée à mes parents, Isabelle et Marc Brunet, à ma sœur Linda et à mon frère Thomas Cette thèse représente l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de ma scolarité Qu'ils en soient remerciés par cette sincère dédicace*:175.
- Bruneton J (1999a) Les tanins. *médicales internationales*, Paris:369-404.
- Bruneton J (1999b) *Toxic plants dangerous to humans and animals*, Intercept Limited.
- Calama R, Cañadas N and Montero G (2003) Inter-regional variability in site index models for even-aged stands of stone pine (*Pinus pinea* L.) in Spain. *Annals of Forest Science* 60:259-269.

- Cao S, Brodie PJ, Callmander M, Randrianaivo R, Rakotobe E, Rasamison VE and Kingston DG (2010) Saponins and a lignan derivative of *Terminalia tropophylla* from the Madagascar Dry Forest. *Phytochemistry* 71:95-99.
- Chahmi N, Anissi J, Jennan S, Farah A, Sendide K and El Hassouni M (2015) Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco. *Asian pacific journal of tropical biomedicine* 5:228-233.
- Chaieb I (2010) Saponins as insecticides: a review. *Tunisian Journal of Plant Protection* 5:39-50.
- Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R and Atik-Bekkara F (2014) Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medical Association* 77:302-307.
- Charrier I, Bloomfield LL and Sturdy CB (2004) Note types and coding in parid vocalizations. I: The chick-a-dee call of the black-capped chickadee (*Poecile atricapillus*). *Canadian Journal of Zoology* 82:769-779.
- Chen C, Yu R, Owuor ED and Kong A-NT (2000) Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Archives of pharmacal research* 23:605-612.
- Chen JJ, Flanagan EP, Jitprapaikulsan J, López-Chiriboga ASS, Fryer JP, Leavitt JA, Weinshenker BG, McKeon A, Tillema J-M and Lennon VA (2018) Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-positive optic neuritis: clinical characteristics, radiologic clues, and outcome. *American journal of ophthalmology* 195:8-15.
- Cheok CY, Salman HAK and Sulaiman R (2014) Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International* 59:16-40.
- Chourfa M and Allem R (2015) Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts in vivo. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25:142-144.
- Chopade AR, Somade PM and Sayyad FJ (2012) Membrane stabilizing activity and protein denaturation: A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Phyllanthus amarus*. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University* 1:67-72.
- Clifford MJ, Royer PD, Cobb NS, Breshears DD and Ford PL (2013) Precipitation thresholds and drought-induced tree die-off: insights from patterns of *Pinus edulis* mortality along an environmental stress gradient. *New Phytologist* 200:413-421.

- da Silva BP, de Sousa AC, Silva GM, Mendes TP and Parente JP (2002) A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 57:423-428.
- da Silva Nunes R, Kahl VFS, da Silva Sarmento M, Richter MF, Costa-Lotufo LV, Rodrigues FAR, Abin-Carriquiry JA, Martinez MM, Ferronato S and Ferraz AdBF (2011) Antigenotoxicity and antioxidant activity of Acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at two stages of ripeness. *Plant foods for human nutrition* 66:129-135.
- Daglia M (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology* 23:174-181.
- Das T, Banerjee D, Chakraborty D, Pakhira M, Shrivastava B and Kuhad R (2012) Saponin: Role in animal system. *Veterinary World* 5:248.
- Dellai A, Souissi H, Borgi W, Bouraoui A and Chouchane N (2013) Antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. *Industrial Crops and Products* 49:879-882.
- Dini I, Schettino O, Simioli T and Dini A (2001) Studies on the constituents of *Chenopodium quinoa* seeds: Isolation and characterization of new triterpene saponins. *Journal of agricultural and food chemistry* 49:741-746.
- Dini I, Tenore GC and Dini A (2009) Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food chemistry* 113:411-419.
- Djahra A, Bordjiba O and Benkherara S (2013) Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.). *Phytothérapie* 11:348-352.
- Djerrad Z, Kadik L and Djouahri A (2015) Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 74:440-449.
- Dominguez-Lerena S, Sierra NH, Manzano IC, Bueno LO, Rubira JP and Mexal J (2006) Container characteristics influence *Pinus pinea* seedling development in the nursery and field. *Forest Ecology and Management* 221:63-71.
- Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, Russell RE and Barnes PJ (2004) Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 287:L774-L783.

- Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy M-É, Tristan A and Vandenesch F (2010) Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*-Les points-clés en 2010. *médecine/sciences* 26:943-949.
- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Bahramian F and Bekhradnia AR (2010) Antioxydant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci* 23:29-34.
- Estrada A, Katselis GS, Laarveld B and Barl B (2000) Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 23:27-43.
- Fablet C and Madec F (2009) Acute phase proteins in pigs: relevance in animal and veterinary public health. *Revue de Médecine Vétérinaire* 160:28-43.
- Fady-Welterlen B (2005) Is there really more biodiversity in Mediterranean forest ecosystems? *Taxon* 54:905-910.
- Fogliani B, Raharivelomanana P, Bianchini J-P, Bourai S and Hnawia E (2005) Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. *Phytochemistry* 66:241-247.
- Francis G, Kerem Z, Makkar HP and Becker K (2002a) The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition* 88:587-605.
- Francis G, Makkar HP and Becker K (2002b) Dietary supplementation with a Quillaja saponin mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 203:311-320.
- Gaussen H (1982) Précis de botanique.
- Gauthier C, Legault J, Lavoie S, Rondeau S, Tremblay S and Pichette A (2008) Synthesis of two natural betulinic acid saponins containing α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -l-arabinopyranose and their analogues. *Tetrahedron* 64:7386-7399.
- Georgantelis D, Ambrosiadis I, Katikou P, Blekas G and Georgakis SA (2007) Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat science* 76:172-181.
- Gershfeld NL and Murayama M (1988) Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: temperature dependence of hemolysis. *The Journal of membrane biology* 101:67-72.
- Ghnimi W (2015) Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de

- leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase, Université de Lorraine.
- Grohs P (2009) Évolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques: la méticilline est-elle encore un marqueur de multirésistance? *Pathologie Biologie* 57:1-8.
- Guettaf S, Abidli N, Kariche S, Bellebcir L and Bouriche H (2016) Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous extract of *Genista Saharae* (Coss. & Dur.). *Der Pharmacia Lettre* 8:50-60.
- Gülçin İ, Mshvildadze V, Gepdiremen A and Elias R (2004) Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta medica* 70:561-563.
- Guo W, Kong E and Meydani M (2009) Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutrition and cancer* 61:807-810.
- Hadjer G and Ibtissam K (2017) Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de deux plantes médicinales locales : *Pinus helpensis* Mill. et *Pinus penea* L. , p 54, Akli mouhand oulhadj - Bouira.
- Hafeez A, Jain U, Sajwan P, Srivastava S and Thakur A (2013) Evaluation of Carrageenan induced anti-inflammatory activity of ethanolic extract of bark of *Ficus virens* Linn. in swiss albino mice. *The Journal of Phytopharmacology* 2:39-43.
- Hafsa J, ali Smach M, Khedher MRB, Charfeddine B, Limem K, Majdoub H and Rouatbi S (2016) Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT-Food Science and Technology* 68:356-364.
- Hagerman A (2002) *Tanin Chemistry. Handbook.* Departemen Chemistry and Biochemistry. Miami Univ, Oxford.
- Hajeb P, Shakibazadeh S and Sloth JJ (2016) Toxic Elements, in *Food Safety* pp 57-87, Springer.
- HAJRIANI S (2020) KARAKTERISTIK EKSTRAK TANIN KULIT PINUS DAN APLIKASINYA SEBAGAI BAHAN PEREKAT KAYU LAMINASI, Universitas Hasanuddin.

- HAMDAOUI N and HEDOUD H (2019) Evaluation de quelques activités biologiques d'extrait préparé à partir de la plante *Plantago albicans* L d'El Oued.
- Hamoudi M, Amroun D, Khennouf S and Dahamna S (2020) Antioxidant Evaluation and Polyphenol Contents of Hydro Ethanolic Extract's Fractions from *Ephedra nebrodensis*. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 10:314-319.
- Hartzfeld PW, Forkner R, Hunter MD and Hagerman AE (2002) Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of agricultural and food chemistry* 50:1785-1790.
- Huong NTT, Matsumoto K and Watanabe H (1998) The antistress effect of majonoside-R2, a major saponin component of Vietnamese ginseng: neuronal mechanisms of action. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 20:65-76.
- Ichikawa H, Takada Y, Shishodia S, Jayaprakasam B, Nair MG and Aggarwal BB (2006) Withanolides potentiate apoptosis, inhibit invasion, and abolish osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and NF- κ B-regulated gene expression. *Molecular cancer therapeutics* 5:1434-1445.
- Jaouadi W, Alsubeie M, Mechergui K and Naghmouchi S (2021) Silviculture of *Pinus pinea* L. in North Africa and The Mediterranean Areas: Current Potentiality and Economic Value. *Journal of Sustainable Forestry* 40:656-674.
- Jati M (2009) Changes in procyanidins and tannin concentration as affected by cocoa liquor roasting. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)* 25.
- Kadri N, Khettal B, Adjebli A, Cresteil T, Yahiaoui-Zaidi R, Barragan-Montero V and Montero J-L (2014) Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial Crops and Products* 54:6-12.
- Kadri N, Khettal B, Aid Y, Kherfellah S, Sobhi W and Barragan-Montero V (2015) 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* 188:184-192.
- Keeragalaarachchi K, Dharmadasa R, Wijesekara R and Kudavidanage EP (2016) Natural antidiabetic potential of *Salacia chinensis* L.(Celastraceae) based on morphological, phytochemical, physico-chemical and bioactivity: a promising alternative for *Salacia reticulata* thw. *World* 4:49-55.

- Khan RA, Khan MR, Sahreen S and Ahmed M (2012) Evaluation of phenolic contents and antioxidant activity of various solvent extracts of *Sonchus asper* (L.) Hill. *Chemistry Central Journal* 6:1-7.
- Khanbabaee K and van Ree T (2001a) Strategies for the synthesis of ellagitannins. *Synthesis* 2001:1585-1610.
- Khanbabaee K and Van Ree T (2001b) Tannins: classification and definition. *Natural product reports* 18:641-649.
- Koula D, Nacera G and Hayat B (2014) Physicochemical and phytochemical characterization of some Algerian honeys types. *International Journal of Applied, Physical and Bio-Chemistry Research* 4:1-16.
- Kren V and Martínková L (2001) Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity". *Current medicinal chemistry* 8:1303-1328.
- Krief S (2003) Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.
- Krief S, Thoison O, Sévenet T, Wrangham RW and Lavaud C (2005) Triterpenoid Saponin Anthranilates from *Albizia g randibracteata* Leaves Ingested by Primates in Uganda. *Journal of natural products* 68:897-903.
- Kumarappan C, Thilagam E and Mandal SC (2012a) Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. *Saudi journal of biological sciences* 19:349-355.
- Kumarappan C, Thilagam E, Vijayakumar M and Mandal SC (2012b) Modulatory effect of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens* on oxidative stress in rats with experimentally induced diabetes. *The Indian journal of medical research* 136:815.
- Lahoum A, Aouiche A, Bouras N, Verheecke C, Klenk H-P, Sabaou N and Mathieu F (2016) Antifungal activity of a Saharan strain of *Actinomyces* sp. ACD1 against toxigenic fungi and other pathogenic microorganisms. *Journal de mycologie medicale* 26:193-200.
- Laid M and Djaballah B (2011) Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'est Algerien.
- Lautrette S, Granet R and Krausz P (2004) A new method of solvent free O- and N-glycosylation using activated carbon fiber (ACF) as a promoter. Application to the synthesis of saponin and nucleoside analogues. *Chemical Communications*:586-587.

- Leong DJ, Choudhury M, Hanstein R, Hirsh DM, Kim SJ, Majeska RJ, Schaffler MB, Hardin JA, Spray DC and Goldring MB (2014) Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse posttraumatic osteoarthritis model. *Arthritis research & therapy* 16:1-11.
- Lepock JR, Frey HE, Bayne H and Markus J (1989) Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 980:191-201.
- Lhuillier A (2007) Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae).
- Li B, Yu B, Hui Y, Li M, Han X and Fung K-P (2001) An improved synthesis of the saponin, polyphyllin D. *Carbohydrate research* 331:1-7.
- Liang X, Jiang Y, Guo Z and Fang S (2020) Separation, UPLC-QTOF-MS/MS analysis, and antioxidant activity of hydrolyzable tannins from water caltrop (*Trapa quadrispinosa*) pericarps. *LWT* 133:110010.
- Liu F-X, Fu S-F, Bi X-F, Chen F, Liao X-J, Hu X-S and Wu J-H (2013a) Physico-chemical and antioxidant properties of four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars in China. *Food chemistry* 138:396-405.
- Liu J, Jia L, Kan J and Jin C-h (2013b) In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology* 51:310-316.
- Locatelli F, Martin-Malo A, Hannedouche T, Loureiro A, Papadimitriou M, Wizemann V, Jacobson SH, Czekalski S, Ronco C and Vanholder R (2009) Effect of membrane permeability on survival of hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology* 20:645-654.
- Lou W, Chen Y, Ma H, Liang G and Liu B (2018) Antioxidant and α -amylase inhibitory activities of tannic acid. *Journal of food science and technology* 55:3640-3646.
- Luo L, Bai R, Zhao Y, Li J, Wei Z, Wang F and Sun B (2018) Protective Effect of Grape Seed Procyanidins against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in PC-12 Neuroblastoma Cells: Structure–Activity Relationships. *Journal of food science* 83:2622-2628.

- Maatalah MB, Bouzidi NK, Bellahouel S, Merah B, Fortas Z, Soulimani R, Saidi S and Derdour A (2012) Antimicrobial activity of the alkaloids and saponin extracts of *Anabasis articulata*. *J Biotechnol Pharm Res* 3:54-57.
- Maier B, Laurer H-L, Rose S, Buurman W and Marzi I (2005) Physiological levels of pro- and anti-inflammatory mediators in cerebrospinal fluid and plasma: a normative study. *Journal of neurotrauma* 22:822-835.
- Makkar HP, Siddhuraju P and Becker K (2007) Saponins, in *Plant secondary metabolites* pp 93-100, Springer.
- Manna SK, Sah NK, Newman RA, Cisneros A and Aggarwal BB (2000) Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor- κ B, activator protein-1, and c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer research* 60:3838-3847.
- Mansour DH (2014) evaluation chimique et activite antidermatophyte de quelques plantes medicinales d'algerie.
- Mehraz R (2017) Evaluation des activités biologiques des extraits du fruit du Cognassier, Université Mouloud Mammeri.
- Mert-Türk F (2006) Saponins versus plant fungal pathogens. *J Cell Mol Biol* 5:13-17.
- Mimouna B and Meriem HM Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile fixe de *Pistacia lentiscus*.
- Mohammadi M, Endelman JB, Nair S, Chao S, Jones SS, Muehlbauer GJ, Ullrich SE, Baik B-K, Wise ML and Smith KP (2014) Association mapping of grain hardness, polyphenol oxidase, total phenolics, amylose content, and β -glucan in US barley breeding germplasm. *Molecular breeding* 34:1229-1243.
- Mølgaard P, Chihaka A, Lemmich E, Furu P, Windberg C, Ingerslev F and Halling-Sørensen B (2000) Biodegradability of the molluscicidal saponins of *Phytolacca dodecandra*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32:248-255.
- Moon J-K and Shibamoto T (2009) Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry* 57:1655-1666.
- Morris CJ (2003) Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Inflammation protocols*:115-121.
- Moualek I, Aiche GI, Guechaoui NM, Lahcene S and Houali K (2016) Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian pacific journal of tropical biomedicine* 6:937-944.
- Mourão LRMB (2013) Estudo in vivo da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira, Universidade de São Paulo.

- Moure A, Franco D, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ and Lema JM (2000) Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry* 48:3890-3897.
- Mueller-Harvey I (2001) Analysis of hydrolysable tannins. *Animal feed science and technology* 91:3-20.
- Muthu C, Ayyanar M, Raja N and Ignacimuthu S (2006) Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and ethnomedicine* 2:1-10.
- Nakhoul J (2020) Dynamique et facteurs influençant la régénération naturelle de *Pinus pinea* L. au Mont Liban, Aix-Marseille Université.
- Nasri N, Khaldi A, Fady B and Triki S (2005) Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: composition and population profiling. *Phytochemistry* 66:1729-1735.
- O’Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao Y-P, O’Brien NM and Williamson G (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis* 551:245-254.
- Oakenfull D (1981) Saponins in food—a review. *Food chemistry* 7:19-40.
- Olchowik-Grabarek E, Sekowski S, Bitiucki M, Dobrzynska I, Shlyonsky V, Ionov M, Burzynski P, Roszkowska A, Swiecicka I and Abdulladjanova N (2020) Inhibition of interaction between *Staphylococcus aureus* α -hemolysin and erythrocytes membrane by hydrolysable tannins: structure-related activity study. *Scientific reports* 10:1-14.
- Oleszek W, Jurzysta M, Ploszynski M, Colquhoun IJ, Price KR and Fenwick GR (1992) Zanic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *Journal of agricultural and food chemistry* 40:191-196.
- Oleszek W and Stochmal A (2002) Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry* 61:165-170.
- Osman A, Wong K and Fernyhough A (2006) ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346:321-329.
- Ozenda P (1991) Les relations biogéographiques des montagnes sahariennes avec la région méditerranéenne. *Revue de géographie alpine* 79:43-53.
- Paiva-Martins F, Barbosa S, Silva M, Monteiro D, Pinheiro V, Mourão JL, Fernandes J, Rocha S, Belo L and Santos-Silva A (2014) The effect of olive leaf supplementation

- on the constituents of blood and oxidative stability of red blood cells. *Journal of functional foods* 9:271-279.
- Paiva-Martins F, Fernandes J, Rocha S, Nascimento H, Vitorino R, Amado F, Borges F, Belo L and Santos-Silva A (2009) Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Molecular nutrition & food research* 53:609-616.
- Pansera MR, Iob GA, Atti-Santos AC, Rossato M, Atti-Serafini L and Cassel E (2004) Extraction of tannin by *Acacia mearnsii* with supercritical fluids. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47:995-998.
- Patra A and Saxena J (2009) The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition research reviews* 22:204-219.
- Peronny S (2005) La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*), Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.
- Rabiei K, Bekhradnia S, Nabavi S, Nabavi S and Ebrahimzadeh M (2012) Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. *elburensis*. *Natural product research* 26:2353-2357.
- RAHMANI S, BELBOUKHARI N, SEKKOUM K and CHERITI A (2016) Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (plumbaginacea). *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"* 6:80-86.
- Raji P, Samrot AV, Rohan DB, Kumar MD, Geetika R, Sharma VK and Keerthana D (2019) Extraction, characterization and invitro bioactivity evaluation of alkaloids, flavonoids, saponins and tannins of *Cassia alata*, *Thespesia populnea*, *Euphorbia hirta* and *Wrightia tinctoria*. *Wrightia tinctoria*:123-137.
- Rejinold NS, Muthunarayanan M, Muthuchelian K, Chennazhi K, Nair SV and Jayakumar R (2011) Saponin-loaded chitosan nanoparticles and their cytotoxicity to cancer cell lines in vitro. *Carbohydrate Polymers* 84:407-416.
- Rodrigo A, Quintana V and Retana J (2007) Fire reduces *Pinus pinea* distribution in the northeastern Iberian Peninsula. *Ecoscience* 14:23-30.
- Romier B, Van De Walle J, During A, Larondelle Y and Schneider Y-J (2008) Modulation of signalling nuclear factor- κ B activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. *British journal of Nutrition* 100:542-551.
- Saboora A, Sajjadi S-T, Mohammadi P and Fallahi Z (2019) Antibacterial activity of different composition of aglycone and glycosidic saponins from tuber of *Cyclamen coum* Miller. *Industrial Crops and Products* 140:111662.

- Sadou N, Seridi R, Djahoudi A and Hadeff Y (2015) Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie* 30:33-39.
- Samal K, Das C and Mohanty K (2017) Application of saponin biosurfactant and its recovery in the MEUF process for removal of methyl violet from wastewater. *Journal of environmental management* 203:8-16.
- Samir A and Benasam ME (2018) Evaluation de l'activité anti inflammatoire in vitro et in vivo de deux plantes de genre *Ephedra*, Université de Jijel.
- Sangeetha G and Vidhya R (2016) In vitro anti-inflammatory activity of different parts of *Pedaliium murex* (L.). *inflammation* 4:31-36.
- Šarac Z, Matejić JS, Stojanović-Radić ZZ, Veselinović JB, Džamić AM, Bojović S and Marin PD (2014) Biological activity of *Pinus nigra* terpenes—evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in biology and medicine* 54:72-78.
- Sarikahya NB, Mkouboi MC, Nalbantsoy A and Elibol M (2021) Cytotoxic and immunomodulator potential of hederagenin saponins from *Cephalaria tchihatchewii*. *Phytochemistry Letters* 44:216-221.
- Sarikahya NB, Nalbantsoy A, Top H, Gokturk RS, Sumbul H and Kirmizigul S (2018) Immunomodulatory, hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species. *Phytomedicine* 38:135-144.
- Sawadogo W, Lompo M, Guissou I and Nacoulma O (2008) Dosage des triterpènes et stéroïdes de *Dicliptera verticillata* et évaluation de leur activité anti-inflammatoire topique. *Médecine d'Afrique Noire* 55:223-229.
- SEIGUE A (1985) La campagne feux de forêts 1984. *Forêt méditerranéenne*.
- Sekowski S, Olchowik-Grabarek E, Wieckowska W, Veiko A, Oldak L, Gorodkiewicz E, Karamov E, Abdulladjanova N, Mavlyanov S and Lapshina E (2020) Spectroscopic, Zeta-potential and Surface Plasmon Resonance analysis of interaction between potential anti-HIV tannins with different flexibility and human serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 194:111175.
- Seladji M, Bekhechi C, Beddou F, Hanane D and Bendimerad N (2014a) Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4:12.

- Seladji M, Bekhechi C and Bendimerad N (2014b) Antioxidant and antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of *Mentha rotundifolia* L. from Algeria. *Int J Pharm Sci Rev Res* 26:40.
- Sepúlveda L, Ascacio A, Rodríguez-Herrera R, Aguilera-Carbó A and Aguilar CN (2011) Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African Journal of Biotechnology* 10:4518-4523.
- Shobana S and Vidhya R (2016) Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon indicum* (Linn.). *World J Pharm Pharm Sci* 5:1182-1196.
- Siddhuraju P and Manian S (2007) The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of dietary phenolic extracts from horse gram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) seeds. *Food chemistry* 105:950-958.
- Siheem H (2017) Etude botanique et phytochimique.
- Sindambiwe J, Calomme M, Geerts S, Pieters L, Vlietinck A and Vanden Berghe D (1998) Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. *Journal of natural products* 61:585-590.
- Singh N and Rajini P (2008) Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chemico-biological interactions* 173:97-104.
- Solano F (2016) Dendroecologia del pino domestico (*Pinus Pinea* L.) nel sud Italia.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI and Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis* 579:200-213.
- Sowndhararajan K, Siddhuraju P and Manian S (2011) Antioxidant and free radical scavenging capacity of the underutilized legume, *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:160-165.
- Sparg S, Light M and Van Staden J (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology* 94:219-243.
- Suwalsky M, Orellana P, Avello M and Villena F (2007) Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology* 45:130-135.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J-O and Dommes J (2009) Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food chemistry* 113:1226-1233.

- Talbi H, AB, KE-m, JT and AH (2014) Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *ournal of Materials and Environmental Science* · January 2015.
- Talbi H, Boumaza A, El-Mostafa K, Talbi J and Hilali A (2015) Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L. *Journal of Materials and Environmental Studies* 6:1111-1117.
- THABEET A, DENELLE N, EL KHORCHANI A, THOMAS A and GADBIN-HENRY C (2007) Etude dendroclimatologique de quatre populations de pin pignon en Tunisie. *Forêt méditerranéenne* 28:219-228.
- Thakur M, Melzig MF, Fuchs H and Weng A (2011) Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Botanics: targets and therapy* 1:19-29.
- Thakur M, Mergel K, Weng A, Frech S, Gilabert-Oriol R, Bachran D, Melzig MF and Fuchs H (2012) Real time monitoring of the cell viability during treatment with tumor-targeted toxins and saponins using impedance measurement. *Biosensors and Bioelectronics* 35:503-506.
- Thibeault D, Gauthier C, Legault J, Bouchard J, Dufour P and Pichette A (2007) Synthesis and structure–activity relationship study of cytotoxic germanicane-and lupane-type 3 β -O-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorganic & medicinal chemistry* 15:6144-6157.
- Tian C, Chang Y, Liu X, Zhang Z, Guo Y, Lan Z, Zhang P and Liu M (2020) Anti-inflammatory activity in vitro, extractive process and HPLC-MS characterization of total saponins extract from *Tribulus terrestris* L. fruits. *Industrial Crops and Products* 150:112343.
- Touaba C and Alatou D (2018) Valorisation du Pin pignon (*Pinus pinea* L.) dans la région de Djebel Ouahch-Constantine, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة.
- Tréchet P and Jouzeau J-Y (2014) Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. *Revue Française d'Allergologie* 54:212-217.

- Vincken J-P, Heng L, de Groot A and Gruppen H (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68:275-297.
- Voutquenne-Nazabadioko L, Gevrenova R, Borie N, Harakat D, Sayagh C, Weng A, Thakur M, Zaharieva M and Henry M (2013) Triterpenoid saponins from the roots of *Gypsophila trichotoma* Wender. *Phytochemistry* 90:114-127.
- Wafa MAARB (2021) Etude de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de quelque plantes de la famille des Apiaceae, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA.
- Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feelisch M and Grisham MB (2001) Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxidants and redox signaling* 3:203-213.
- Woldemichael GM and Wink M (2001) Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of agricultural and food chemistry* 49:2327-2332.
- Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T and Matsuda H (2001) Medicinal flowers. III. Marigold.(1): hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49:863-870.
- Yu B, Li B, Xing G and Hui Y (2001a) A "double random" strategy for the preparation of saponin libraries. *Journal of combinatorial chemistry* 3:404-406.
- Yu B, Liao J, Zhang J and Hui Y (2001b) The first synthetic route to furostan saponins. *Tetrahedron letters* 42:77-79.
- Yücekutlu AN and BİLDACI I (2008) Determination of Plant Saponins and Some of *Gypsophila* Species: A review of the literature. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 36:129-135.
- Zhang F, Yang Y, Su P and Guo Z (2009) Microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Phytochemical analysis* 20:33-37.
- Zhou K, Shi L, Wang Z, Zhou J, Manaenko A, Reis C, Chen S and Zhang J (2017) RIP1-RIP3-DRP1 pathway regulates NLRP3 inflammasome activation following subarachnoid hemorrhage. *Experimental neurology* 295:116-124.

- Zimmer N and Cordesse R (1996a) Digestibility and ruminal digestion of non-nitrogenous compounds in adult sheep and goats: Effects of chestnut tannins. *Animal feed science and technology* 61:259-273.**
- Zimmer N and Cordesse R (1996b) Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions animales* 9:167-179.**
- Zou Y, Lu Y and Wei D (2004) Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry* 52:5032-5039.**

Annexes

ANNEXES

Annexes 01 : réactifs et appareillages utilisés.

	Etapes	Réactifs / solvants / solutions	Appareillage / Autres
Récupération des extraits	Extraction	Saponines Ethanol 20% Eau distillée Ether di éthylique N butanal Chlore de sodium (NaCl) 5% Tannins Acétone 70% Eau distillée	Broyeur électrique Balance analytique Soxhlet Tamis Centrifugeuse réfrigérée Agitateur magnétique Barreaux magnétiques Ultra sans / Etuve Bin marin / L'hôte Papier Whatman Congélateur -4°C Ampoule a décanté
Activité anti oxydant	Test ABTS Test FRAP	Acid ascorbique Solution ABTS Eau distillée Ferrique de potassium (1%) FeCl3 (0,1%) Solution TCA (10%) Tampon phosphate PB (0,2 M, pH =6,6) Ethanol Solution BHA Solution BHT Phosphate disodique Na ₂ HPO ₄ Phosphate de sodium NaH ₂ PO ₄ Extraits (tannin et saponine)	Agitateur magnétique Barreaux magnétiques Bin marin Vortex Spectrophotomètre-UV-visible pH mètre



Activité anti microbienne	<p>Anti bactérienne</p> <p>Anti fongique</p>	<p>Amoxicilline commercialisée (à 10µg/disque)</p> <p>Nystatine (10µg/disque)</p> <p>Extraits (tannin et saponine)</p>	<p>Bec benzène</p> <p>L'hôte</p> <p>Etuve 37°C</p> <p>Etuve 22°C</p> <p>Pied à coulisse</p> <p>Disques antibiotiques</p>
Activité anti hémolytique	<p>Test de protection de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique</p> <p>Test de protection de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique</p>	<p>Tampon phosphate salin (PBS) :</p> <p>PBS (pH 7,5 ; 0,9 NaCl)</p> <p>PBS (pH 7,5 ; 0,7 NaCl)</p> <p>PBS (pH 7,5 ; 0,5 NaCl)</p> <p>Aspirine</p> <p>Suspension érythrocytaire 2% Extraits tannin et saponine</p>	<p>Centrifugeuse réfrigérée</p> <p>Bain marin</p> <p>Spectrophotomètre-UV- visible</p>
Activité anti inflammatoire	Test de dénaturation thermique des protéines	<p>Eau Physiologique 0,9%</p> <p>Solution diclofénac 75mg</p> <p>Solution de carra génine 1%</p> <p>Solution Prozil fort 100ml</p> <p>Extraits (tannin et saponine) 100mg/kg</p>	<p>Sonde de gavage</p> <p>Pied à coulisse</p> <p>Balance analytique</p> <p>Lame de bistouri Swann Morton</p> <p>Seringue</p>



Annexe 02 : préparation des solutions de travail**1. Préparation de solution de PBS 0.2 M (pH 6,6)**

1,281 g de Phosphate disodique (Na_2HPO_4) + 1,766 g de Phosphate de sodium (NaH_2PO_4) dissoudre dans 80 ml DH_2O sous agitation jusqu'à dissoudre complet (pH 6,6), complète jusqu'à 100 ml DH_2O .

2. Préparation de solution FeCl_3 0.1 % :

0,1 g dissoudre dans 100 ml l'eau distillée.

3. Préparation de solution ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) Ferricyanure de potassium 1 % :

1 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dissoudre dans 100 ml l'eau distillée.

4. Préparation d'acide trichloracétique (TCA) à 10 %

10 g acide trichloracétique dissoudre dans 100 ml l'eau distillée.

5. Préparation des Solutions PBS à différentes concentrations de NaCl

- a. Solution tampon phosphate saline (PBS 0,9 % NaCl) : 0,9 % g de NaCl + 20 mg KCl + 0,144 g de NaHPO_4 + 24 mg KH_2PO_4 dans 80 ml de H_2O à pH de 7,4 sous agitation jusqu'à dissoudre complet puis complète jusqu'à 100 ml DH_2O .
Les mémé étapes pour PBS (0,7 % NaCl ; 0,5 % NaCl) avec des concentration 0,7 % g et 0,5 % g NaCl a pH de 7,4.

6. Préparation de solution érythrocytaire 2%

- a. Prélèvement de sang à partir d'un sujet sain et collecté dans des tubes héparinés, réalisation d'une centrifugation 3000 rpm pendant 10 min à 4°C retiré le plasma (surnageant), le culot érythrocytaire est lavé trois fois successivement avec du tampon phosphate salin (PBS) (pH 7,5 ; 0,9 % NaCl).
- b. 2 ml de suspension érythrocytaire + 98 ml PBS (pH 7,5 ; 0,9 % NaCl).

7. Préparation de ABTS (solution mère)

Préparée en mélangeant progressivement : L'ABTS a été dissous dans l'eau distillée à une concentration de 7 mM ABTS en incubant pendant 12 à 16 h à l'obscurité et à la température ambiante (solution mère) + 2,45 mM persulfate de potassium $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: 2 ml ABTS + 120 ml éthanol absolu $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Abs de $0,700 \pm 0,02$ à 734 nm).



8. Préparation de solution Butylated hydroxyanisole / Butylated hydroxytoluène

10 mg de BHA/BHT dissoudre dans 10 ml de DH₂O

9. Préparation de solution d'acide ascorbique

10 g d'acide ascorbique (poudre) + 10 ml DH₂O

10. Préparation de l'acétone 70 %

70 ml acétone + 30 ml DH₂O

11. Préparation de Chlore de sodium (NaCl 5 %)

5 g NaCl + 95 ml DH₂O

12. Préparation de l'éthanol 20 %

20 ml éthanol + 80 ml DH₂O

13. Préparation de la solution de référence

Pour la préparation de cette solution, un comprimé de Diclofénac (75 mg) a été dissout dans 15 ml d'eau physiologique.

14. Préparation de la solution de carragénine

Pour la préparation de la solution de carragénine, 0,5 g de la carragénine est ajouté progressivement à 25 ml d'eau distillée et ajuster le volume à 50 ml avec d'eau distillée.



Annexe 03 : Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de *Pinus pinea L.* testés contre les souches bactériennes et fongiques.

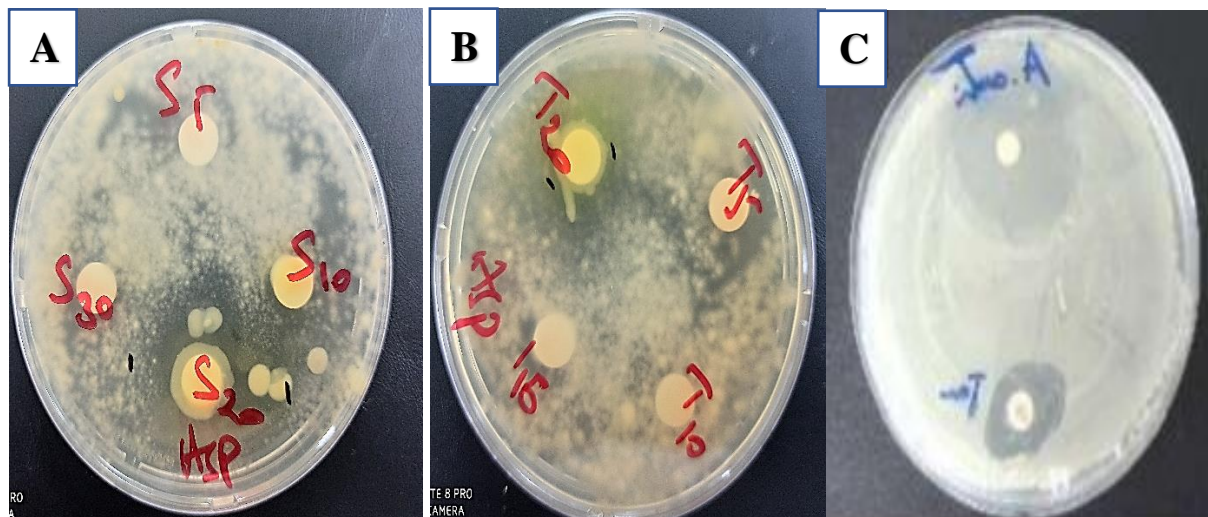


Figure 01 : effet des extraits saponique et hydroalcoolique de *Pinus pinea L.* sur la croissance de *Aspergillus brasiliensis* : A : Extrait saponique, B : extrait hydroalcoolique, C : Témoins positif (Nystatine), négatif (l'eau distillée ou DMSO).

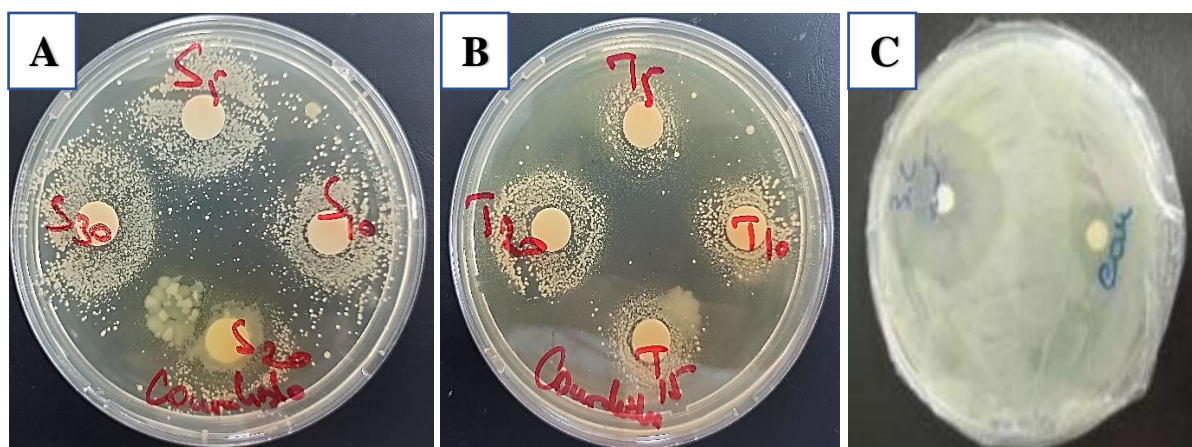


Figure 02 : effet des extraits saponique et hydroalcoolique de *Pinus pinea L.* sur la croissance de *Candida albicans* : A : Extrait saponique, B : extrait hydroalcoolique, C : Témoins positif (Nystatine), négatif (l'eau distillée ou DMSO).



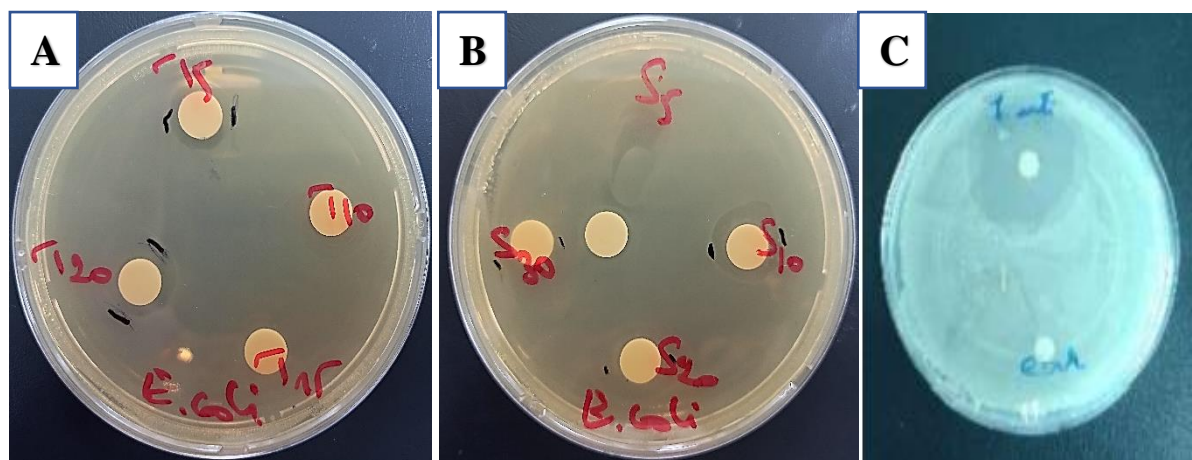


Figure 03 : effet des extraits saponique et hydroalcoolique de *Pinus pinea* L. sur la croissance de *Escherichia coli* : A : Extrait saponique, B : extrait hydroalcoolique, C : Témoins positif (Amoxicilline), négatif (l'eau distillée ou DMSO).

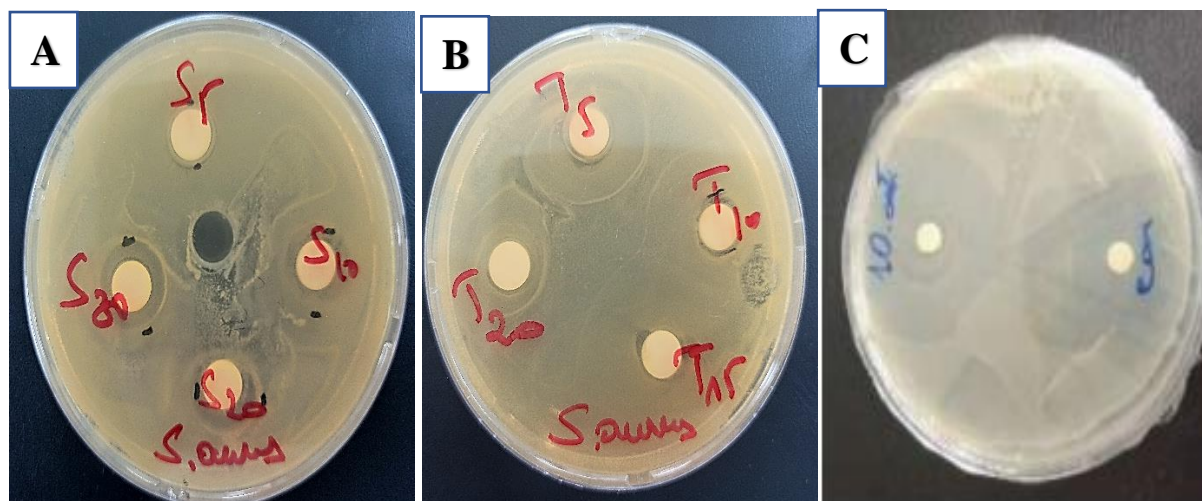


Figure 04 : effet des extraits saponique et hydroalcoolique de *Pinus pinea* L. sur la croissance de *Staphylococcus aureus* : A : Extrait saponique, B : extrait hydroalcoolique, C : Témoins positif (Amoxicilline), négatif (l'eau distillée ou DMSO).



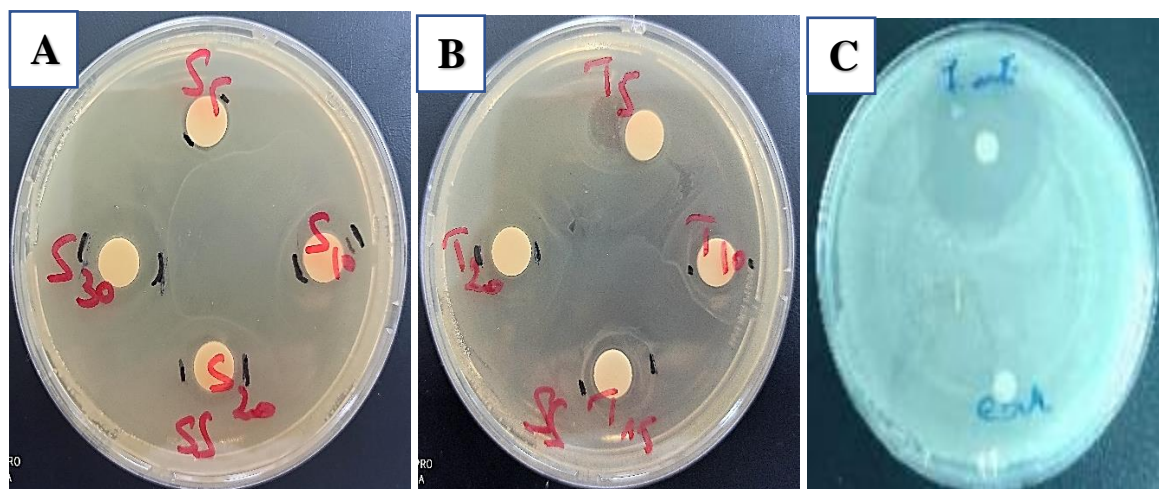


Figure 05 : effet des extraits saponique et hydroalcoolique de *Pinus pinea* L. sur la croissance de *Salmonella* spp : A : Extrait saponique, B : extrait hydroalcoolique, C : Témoins positif (Amoxicilline), négatif (l'eau distillée ou DMSO).

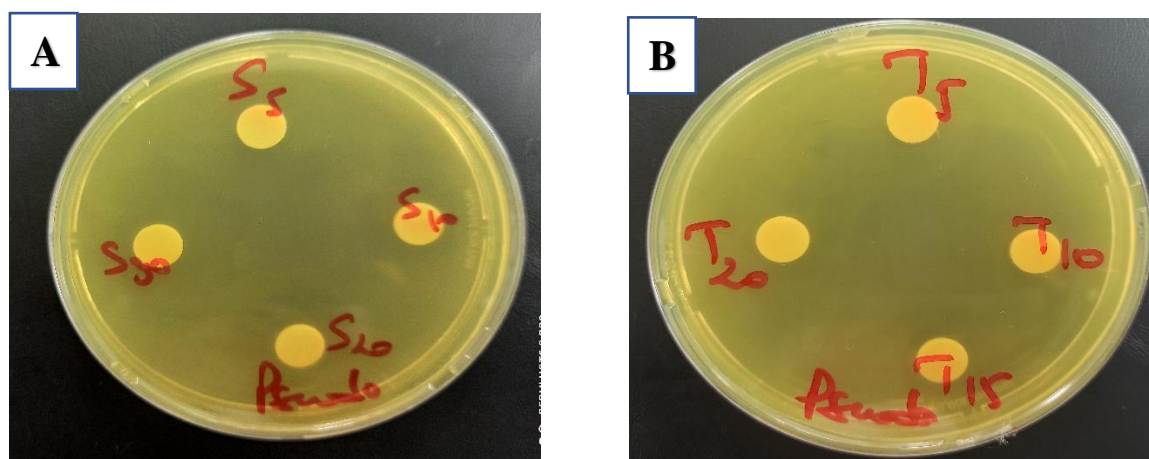


Figure 06 : effet des extraits saponique et hydroalcoolique de *Pinus pinea* L. sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* : A : Extrait saponique, B : extrait hydroalcoolique, Témoins positif (Amoxicilline), négatif (DMSO).



Résumé

Le travail réalisé se focalise sur l'étude des extraits aqueux de tannin et saponique des graines complètes de *Pinus pinea* Linné et l'évaluation des activités antimicrobiennes, anti hémolytique, leurs propriétés antioxydantes *in vitro* et anti-inflammatoires *in vivo*. Les résultats de l'activité antifongique montrent que *Aspergillus brasiliensis* est très sensible aux deux extraits avec des zones d'inhibition élevées de 20 à 28 mm. L'extrait saponique a montré une activité antibactérienne vis à vis des deux souches bactériennes Gram + (*E. coli*, *staphylococcus aureus*) et une souche Gram - (*Salmonella ssp*). Concernant l'extrait hydroalcoolique, il s'est révélé actif envers cinq souches microbiennes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica ssp*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*). Les extraits de tanins et saponines ont montré un effet protecteur très important vis à vis de l'hémolyse induite par des solutions salines avec des pourcentages de protection de $66,72 \pm 0,415$ % à 0,5 % NaCl et $61,91 \pm 1,107$ % à 0,7 % NaCl, respectivement et des pourcentages de protection allant de (46,49 à 57,21 %) vis-à-vis du stress thermique. Ils présentent aussi des propriétés antioxydantes concentration-dépendantes considérables avec un pourcentage d'inhibition totale de (100 %) vis à vis du radical ABTS⁺ et une capacité de diminuer le volume de la patte de la souris induite par la carragénine avec des pourcentages de réduction de l'œdème très élevé : saponine $75,65 \pm 0,562$ % et tanin $75,19 \pm 2,503$ % par rapport à une concentration de 100 mg/ml. Les résultats obtenus confirment que les deux extraits présentent un fort pouvoir antiinflammatoire.

Mot clés : *Pinus pinea* Linné, tannin, saponine, activité antioxydante, activité antiinflammatoire, activité antimicrobienne.

Abstract

The work carried out is focused on the study of the aqueous extracts of tannin and saponic of the complete seeds of *Pinus pinea* Linné and the evaluation of the antimicrobial activities, anti-hemolytic, their antioxidant properties *in vitro* and anti-inflammatory *in vivo*. The results of the antifungal activity show that *Aspergillus brasiliensis* is very sensitive to both extracts with high inhibition zones from 20 to 28 mm. The saponic extract showed antibacterial activity against two Gram + bacterial strains (*E. coli*, *staphylococcus aureus*) and one Gram - strain (*Salmonella ssp*). Concerning the hydroalcoholic extract, it proved to be active against five microbial strains (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica ssp*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*). Tannin and saponin extracts showed a very important protective effect against saline-induced hemolysis with protection percentages of $66,72 \pm 0,415\%$ at 0,5% NaCl and $61,91 \pm 1,107\%$ at 0,7% NaCl, respectively, and protection percentages ranging from (46,49 to 57,21%) against heat stress. They also show considerable concentration-dependent antioxidant properties with a total inhibition percentage of (100%) towards the ABTS⁺ radical and an ability to decrease the volume of the mouse paw induced by carrageenan with very high edema reduction percentages: saponin $75,65 \pm 0,562\%$ and tannin $75,19 \pm 2,503\%$ in relation to a concentration of 100 mg/ml. The results obtained confirm that both extracts have a strong anti-inflammatory power.

Key words: *Pinus pinea* Linné, tannin, saponin, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity.

الملخص

يركز العمل المصطلح به على دراسة المستخلصات الصبغية المائية tanin و saponine لبذور *Pinus pinea* Linné الكاملة وتقييم الأنشطة المضادة للميكروبات و hémolytique وخصائصها المضادة للأكسدة *in vitro* ومضادات الالتهاب *in vivo*. وتظهر نتائج النشاط المضاد للالتهابات أن *Aspergillus brasiliensis* حساس جدا لكل من المستخلصات مع مناطق منع عالية من 20 إلى 28 ملم. وقد أظهر مستخلص saponine نشاطاً مضاداً للبكتيريا في مواجهة السلالتين البكتيريتين جرام + (*E.coli*, *staphylococcus aureus*) وبالنسبة للمستخلص tanin ، فقد كان نشاطاً ضد خمس سلالات جرثومية وسلالة جرام- (*E.coli*, *staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Salmonella*). أظهرت مستخلصات tanin و saponine تأثيراً وقائياً بالغ الأهمية مع نسبة من الحماية ضد الإجهاد الملحي (66.72%) و 0.5NaCl % و 61.91% و 0.7NaCl % على التوالي ونسبة من الحماية ضد الإجهاد الحراري (46.49% إلى 57.21%). كما تتمتع بخصائص كبيرة من مضادات الأكسدة تعتمد على التركيز ABTS⁺ مع نسبة إجمالية مانعة (100%). والقدرة على خفض حجم ساق الفأر التي يحفزها carragénine مع نسب انخفاض الوريد وحماية عالية للغاية $75.19 \pm 2.503\%$ و $75.65 \pm 0.562\%$ saponine مقارنة بتركيز 100 ملغ/مل. وتؤكد النتائج أن لكل من المقتطفين قوة قوية لمكافحة الالتهابات.

الكلمات الرئيسية: *Pinus pinea* Linné، tanin، saponine، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للالتهاب، نشاط مضاد للميكروبات.

