

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



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

DAHAS Lilia & BAGHDOUD Cherifa

Thème

***Evaluation de l'activité antioxydante et anti-hémolytique
d'un extrait alcaloïdique de la coque des graines de Pinus
pinæa L.***

Soutenu le : 15 / 09 / 2021

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M. LAKBAL Farouk

MAA

Univ. de Bouira

Président

M. KADRI Nabil

MCA

Univ. de Bouira

Promoteur

M. BENZITOUNE Nourelimane

Doctorante

Univ de Bouira

Co-Promoteur

M. CHERGUI Achour

MCB

Univ de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2020/2021

Remerciement

Avant tous, nous tenons à remercier Allah le tout puissant qui nous a donné les ailes du savoir, le courage, la patience et la volonté pour poursuivre nos études et pouvoir accomplir ce modeste travail.

*Nous exprimons toute notre profonde reconnaissance et nos sincères remerciements à notre promoteur **Dr KADRI NABIL** de nous avoir confié ce sujet de recherche, pour ses précieux conseils, ses remarques pertinentes ainsi que son encouragement et son orientation.*

Nous le remercions également pour sa compréhension, sa responsabilité et sa disponibilité tout au long de ce travail, et surtout pour sa patience dans la correction de ce manuscrit, pour son savoir qui nous a bien transmis durant son enseignement.

*Notre Co-promotrice **BENZITOUNE Nour el Imane** qui a codirigé notre projet avec plein de sagesse et pour ses précieux conseils et son orientation, Nous le remercions également pour sa compréhension sa gentillesse pendant toute la période du stage.*

Nous remercions les membres de jury d'avoir accepté de juger notre travail. Nos sincères remerciements vont également à l'ensemble des enseignants du département de Biochimie, tous ceux qui ont participé de loin ou de près à l'élaboration de ce modeste travail.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à mes chers parents qui trouvent ici le témoignage de ma profonde Gratitude.

*Ma mère **Kadidja** 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 **Mohamed**, 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 frères : **Abdellah et Adem***

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.

À la mémoire de mes grands-parents que dieu ait leur âme, qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur.

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

A tous les membres de ma famille, mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines.

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

A tous mes amies.

A tous mes camarades de la promotion Master II « Biochimie appliquée ».

A tous mes enseignants qui m'ont marquée.

Lilia

DEDICACES

Je dédie ce travail

À ma famille, qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui et en particulier

❖ *Ma mère **Tounes**, 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 **ALI**, 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.*

❖ *À mes frères (**Mohammed lamine, chams aldine**) et ma sœur (**Amel**)*

❖ *A mon fiancé **Ahmad** et sa famille.*

❖ *A tous mes cousins, mes voisins et tous mes amis.*

Je leurs dit avec ces simples mots, merci pour votre encouragement, votre soutiens le long de ce travail Votre soutiens le long de ce travail.

Cherifa.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS : 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AS : Acide salicylique

AFR : Acrobate free radical

BHA: Butyl Hydroxy Anisol

BHT: *Butylated hydroxy toluene*

CHCl₃ : Chloroforme

CO₃ : Anion radicalaire carbonate

DO : Densité optique

DPPH : Diphenyl-picrylhydrazyle

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FAN : Formes actives de l'azote

FAO : Formes actives de l'oxygène

FeCl₃ : Chlorure de fer

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

FRAP : Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter

g : Gramme

GR : Globules rouges

GRh : Globules rouges humains

HSP : Heat shock protein

KCl : Chlorure de potassium

KH₂PO₄ : Potassium dihydrogen phosphate monobasique

K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium

Hb: Hémoglobine

HCl : Acide chlorhydrique

L : Litre

mg : Milligramme

min : Minute

mL : Millilitre

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NaH₂PO₄ : Sodium phosphate monobasic

Na₂HPO₄ : Sodium phosphate dibasic

OH : Groupe hydroxyle

O₂ : Oxygène moléculaire

O²⁻ : Anion super-oxyde

¹O₂ : Oxygène singulet

PBS : Tampon phosphate salin

pH : Potentiel hydrogène

PMRS : Plasma membrane redox system

PI : Pourcentage d'inhibition

rpm : Rotation par minute

TCA : Acide trichloracétique

TLR : Récepteurs Toll-like

μL : Microlitre

LISTE DES FIGURES

Figure 1: photographies originales de l'arbre de <i>Pinus</i> (a), des cônes (b), des graines (c).....	4
Figure 2: Aire de répartition naturelle du <i>Pinus pinea</i> L. dans le monde.....	5
Figure 3: Structure chimique de galéguine.	7
Figure 4: Structure chimique de nicotine.....	7
Figure 5: Structure chimique de cocaïne	7
Figure 6: Structure chimique de cocaïne	8
Figure 7: Structure chimique de morphine.	8
Figure 8 : Schéma récapitulatif de l'extraction des alcaloïdes à partir de la coque des graines de <i>P. pinea</i> L.	16
Figure 9: Solution érythrocytaire	18
Figure 10 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS en fonction des différentes concentrations de l'extrait alcaloïdique.....	21
Figure 11: Pouvoir réducteur de l'extrait alcaloïdique en fonction de la concentration.....	23
Figure 12: L'effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique induit par 0,5, 0,7 et 0,9 % du NaCl.	24
Figure 13: L'effet protecteur de l'acide salicylique vis-à-vis d'un stress osmotique induit par 0,5, 0,7 et 0,9 % du NaCl.....	25
Figure 14: L'effet protecteur de l'extrait et de l'acide salicylique vis-à-vis d'un stress thermique....	26

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : La position taxonomique de <i>Pinus Pinea</i> L.	3
Tableau II : Relations entre les maladies et le stress oxydant	11
Tableau III : Le pouvoir antioxydant de l'extrait alcaloïdique et des antioxydants synthétiques exprimés en mg/ml.....	22

SOMMAIRE

Liste des abreviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le pin pignon 3

I.1. Systématique et nomenclature 3

I.2. Description botanique 4

I.3. Aire de répartition géographique de pin pignon 4

I.4. Propriété thérapeutique et usage traditionnelle 5

II. Les métabolites secondaires 6

II.1. Les alcaloïdes 6

II.1.1. Définition..... 6

II.1.2. Classification structurel des alcaloïdes..... 6

II.1.3. Propriétés physiques et chimiques des alcaloïdes 8

II.1.4. Propriétés thérapeutiques et médicinales des alcaloïdes..... 8

III. Hémolysé et activité anti-hémolytique 8

III.1. Hémolysé 8

III.1.1. Définition 8

III.1.2. Types d'hémolysé 9

III.1.3. Action des anti-hémolytiques synthétiques..... 9

III.1.4. Mécanismes physiologiques de maintien de l'intégrité de la membrane Erythrocytaire 9

IV. Radicaux libres et activité antioxydante 10

IV.1. Radicaux libres 10

IV.2. Stress oxydatif..... 10

IV.2.1. Les pathologies liées au stress oxydant	11
IV.3. Les antioxydants	11
IV.3.1. Définition	11
IV.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants	12

Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	13
I.1. Matériel végétal	13
I.2. Sang	13
I.3. Réactifs et solvants	13
II. Méthodes	13
II.1. Préparation de la poudre végétale	13
II.2. Extraction assistée par ultrasons des alcaloïdes	13
II.3. Le rendement d'extraction.....	14
II.4. Evaluation des activités biologiques	16
II.4.1. Etude de l'activité antioxydante de l'extrait alcaloïdique	16
II.4.2. Etude de l'activité anti-hémolytique de l'extrait alcaloïdique.....	17

Résultats et Discussion

I.Rendement d'extraction des alcaloïdes	20
II.Evaluation de l'activité antioxydante	20
II.1. Activité anti-radicalaire ABTS ⁺	20
II.2. Pouvoir réducteur (FRAP).....	22
III. Evaluation de l'activité anti-hémolytique.....	23
III.1. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique.....	23
III.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique	25
Conclusion generale et perspectives	27

Références bibliographique

Annexes

Introduction générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis l'antiquité l'homme utilise son environnement en particulier les plantes comme une source principale pour survivre, au besoin en nutriments et comme remèdes contre plusieurs maladies. De nos jours, les plantes médicinales ont une grande importance dans le domaine de la santé publique grâce aux thérapeutiques qu'elles acquièrent (**Karou et al., 2005**).

Les plantes médicinales possèdent une richesse en propriété biologique comme des agents médicamenteux peuvent avoir également des usages alimentaires...et des agents médicinaux tels que les antioxydant et les anti hémolytiques (**Belyagoubi 2011**).

Actuellement, dans les pays du tiers monde en particulier, la phytothérapie occupe encore une place importante. La flore végétale de ces pays reste assurément riche et prometteuse, tant dans la perspective de découvrir de nouvelles espèces botaniques que de trouver de nouvelles molécules ayant une activité thérapeutique (**Messai et al., 2010**).

Parmi les plantes qui n'ont pas fait l'objet d'études détaillées, on trouve la coque des graines de *pinus pinea* L qui porte un intérêt thérapeutique et qui est connu par sa composition en principes actifs tel que les alcaloïdes connus pour leurs vertus thérapeutiques. Le genre *Pinus* comprend environ 800 espèces dans le monde, principalement concentrées dans ; hémisphère nord (**Nergiz and İclalDönmez 2004**).

Le Pin pignon a été introduit depuis fort longtemps en Afrique du Nord. En Algérie, les plantations de cette plante ont été réalisées entre 1935 et 1974. D'autres reboisements existent dans les zones littorales à l'Est du pays sous forme de petits bouquets à proximité des habitations (**Karaali et al., 2011**).

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires de nature hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, bio-synthétisé à partir d'acide aminé de faible poids moléculaires. Les propriétés médicinales des alcaloïdes rendent les groupes métabolites secondaires particulièrement intéressant. Ces métabolites constituent la base scientifique de l'utilisation thérapeutique.

Dans cette optique, notre objectif principal porte essentiellement sur :

- ✚ La préparation d'un extrait alcaloïdique à partir de la coque des graines de *Pinus pinea* L.
- ✚ L'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes et anti-hémolytique de notre extrait ;

Ainsi, ce manuscrit est divisé en trois parties :

- ✚ La première partie est un aperçu bibliographique sur l'étude de la plante médicinale *Pinus pinea* L., son nom scientifique et sa taxonomie, sa description botanique, sa répartition géographique et ses propriétés thérapeutiques), les alcaloïdes (biosynthèse, classification et propriétés) et leurs activités biologiques (antioxydant et anti-hémolytique)
- ✚ La deuxième partie de ce travail été consacré aux différentes méthodes expérimentales appliquées ainsi qu'au matériel utilisé
- ✚ La troisième partie été consacré aux résultats et discussion relatifs à l'activité antioxydant et anti hémolytique de ces alcaloïdes.

Notre étude s'achèvera par une conclusion générale regroupant tous les résultats obtenus avec des recommandations sur les futurs travaux qui clôturent ce mémoire.

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur 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 bois et de pignons (Calama *et al.*, 2003).

Il s'agit d'une espèce plastique résistante à la sécheresse et au froid, adaptée aux conditions climatiques de la région méditerranéenne, préférant les stations de haute altitude et prospérant également sur les dunes côtières. (Derouèche 2015).

Pinus pinea L. a été introduit depuis longtemps en Afrique du Nord. En Algérie, les plantations de cette plante ont été réalisées entre 1935 and 1974. Il existe actuellement de très belles pinèdes de pin pignon datant des années 1970, notamment à Oran, celles de Sidi lakhdar où le pin pignon est mêlé au pin d'Alep et à quelques eucalyptus (Letreuch-Belarouci 1991). D'autres reboisements existent dans les zones littorales de l'Est du pays sous forme de petits bouquets à proximité des habitations (Karaali *et al.*, 2011).

De nombreuses hypothèses sont actuellement formulées sur la phylogénie de *Pinus pinea* L. Selon Klaus and Ehrendorfer (1989), cette espèce appartient au groupe des Pins méditerranéens au sens strict (*P. canariensis*, *P. halepensis*, *P. brutia*, etc.), dont *P. pinea* L. partagerait vraisemblablement l'origine.

I.1. Systématique et nomenclature

Le Pin parasol, Pin pignon en Français, nommé par les anglophones Stone pine ou Umbrella pine et senouber el-thamri (الصنوبر الثمري) en arabe (Fady 2005). Selon Gausсен (1930) le pin pignon (*Pinus pinea* L.) appartient à la famille des Pinaceae, classe des Coniférospidae. Sa position taxonomique est la suivante (Tableau I) :

Tableau I : La position taxonomique de *Pinus Pinea* L. (Gausсен 1930).

Taxonomie	Description
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement	<i>Gymnosperme</i>
Ordre	<i>Conifères</i>
Sous-Ordre	<i>Pinaceae</i>
Genre	<i>Pinus</i>
espèce	<i>Pinea</i>

I.2. Description botanique

Le pin pignon peut atteindre 15-25m 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 2014**).

Il vit entre 200 à 250 ans, mais certains auteurs ont signalé des spicimens de plus de 400 ans, les bourgeons sont cylindriques, pointus, avec des écailles réfléchies, d'un brun clair, arbres monoïques, forment des inflorescences cylindriques. Les aiguilles, d'un vert glauque, réunies sur les rameaux sont généralement fasciculés par deux. Elles mesurent de 10 à 20 cm de long et 1,5 à 2 mm d'épaisseur. Elles sont flexibles et dentées, et ont un apex pointu souvent jaunâtre. La floraison a lieu entre mai et juin, et la fructification au cours du troisième automne suivant la floraison (**Adili 2012**). L'aspect morphologique de *Pinus pinea* L. est représenté dans la **figure 1**.



Figure 1: photographies originales de l'arbre de Pinus (a), des cônes (b), des graines (c)

(**Adili 2012**)

I.3. Aire de répartition géographique de pin pignon

Le pin pignon a une répartition circumméditerranéenne, du Portugal jusqu'à la Syrie. Il a longtemps été cultivé à des fins ornementales et pour la production de graines. L'abondance de l'espèce se situe dans la partie nord-ouest de la méditerranée, à savoir l'Espagne (28000ha), l'Italie (13400 ha) (**Boudy 1950**).

La superficie totale couverte par le pin pignon est environ 600 000 ha (75% en Espagne, 9% au Portugal, 8% en Turquie, 7% en Italie, 3% en Tunisie, 0,5% au Maroc avec des pourcentages inférieurs en Grèce, Liban, Algérie et France) (**Adili 2012**). L'aire de répartition naturelle du *Pinus pinea* L. dans le monde est représentée dans la **figure 2**.

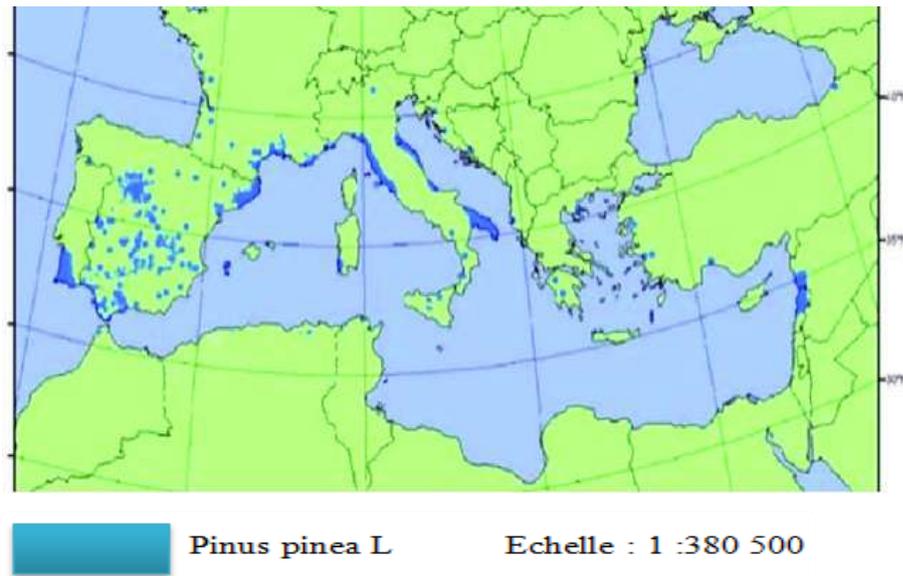


Figure 2: Aire de répartition naturelle du *Pinus pinea* L. dans le monde (Sbay and Hajib, 2016)

En Tunisie, le pin pignon occupe actuellement 20000 ha environ sur les dunes littorales, dans les subéraies dégradées et dans les maquis (Adili 2012). Au Liban, a été estimé que les peuplements sont d'origine artificielle (Post 1932). Au Maroc, les plantations de pin pignon ont été réalisées principalement dans le nord du pays, le long de la côte. Les reboisements récents sont surtout localisés dans la région de Tanger, Larache et Tétouan (Sbay 2000).

En Algérie, il pousse bien sur les dunes littorales de Mostaganem à Bourahma, Bouachria, Khadra et Stidia. Il constitue une magnifique pinède à Ouled Baroudi (THABEET *et al.*, 2007). Comme il se trouve dans la forêt d'Akboub .

Il existe également à Relizane, la Mactaa (Oran), El Kala, Djebel Ouahche (Constantine), Blida, Setif et Zéralda (Zanndouche 2001).

I.4. Propriété thérapeutique et usage traditionnel

Pinus pinea L. est très connu pour ses propriétés en médecine traditionnelle, il est comme cataplasme pour plusieurs maladies y compris un effet sur la fatigue. Il est aussi connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, anti-âge, antinéoplasiques, antibactériennes, liées à leurs effets sur l'activité de cyclo-oxygénase, anticancéreux, et anti-oxydantes. Il est utilisé aussi pour traiter la tuberculose, et soulager et les infections urinaires, les angines et les douleurs d'estomac, il est considéré comme possédant une valeur nutritionnelle importante (Kadri and khettal 2015).

L'huile essentielle de *Pinus pinea* L. a une activité antifongique, elle a la capacité d'inhiber la croissance des champignons pathogènes des plantes tels que *Sinapis arvensis* L, *Lolium rigidum* Gaud et *Raphanusra phanistrum* (Amri *et al.*, 2012). Elle est également connue pour être un

puissant antiseptique pour les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires et efficace dans les infections Pulmonaires tels que la grippe, la sinusite, les rhumatismes. Les bourgeons de cette espèce sont utilisés en parfumerie et en savonnerie (**Feikh 2014**).

II. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des produits à la structure chimique souvent complexe, il existe plusieurs milliers de métabolites (au moins 30 000 structures caractérisées) et sont classés en fonction de leur appartenance chimique (**Judd et al., 2002**). Parmi ces substances, on trouve des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins, des saponosides, des terpénoïdes et des stéroïdes et des alcaloïdes qui présentent de multiples intérêts utilisés dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (**Iserin et al., 2007**).

II.1. Les alcaloïdes

II.1.1. Définition

Le terme alcaloïde a été introduit au début du 19^{ème} siècle pour désigner les substances naturelles qui réagissent comme des bases, telles que les alcalis (**Bruneton 1999a**).

Un alcaloïde est un métabolite secondaire naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, bio-synthétisé à partir d'acides aminés de faible poids moléculaire, de structure chimique complexe plus ou moins basique et doté de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose et de propriétés pharmacologiques marquées (**Aniszewski 2007**).

Les alcaloïdes constituent l'une des plus grandes familles de métabolites secondaires, avec près de 10 000 à 12 000 structures différentes (**Donatien 2009**).

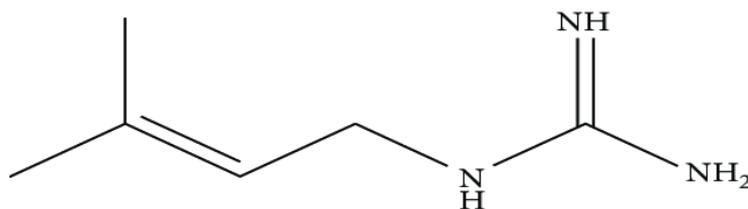
On distingue :

- ✓ **Les pseudo-alcaloïdes** : Ne possèdent pas d'azote intra cyclique et l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale.
- ✓ **Les proto-alcaloïdes** : L'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ils sont Elaborés à partir d'acides aminés.
- ✓ **Les alcaloïdes vrais** : sont classés selon la nature de leur cycle. L'atome d'azote est inclus dans un hétérocycle. Bio-synthétisés à partir d'acides aminés et ils possèdent une activité pharmacologique marquée.

II.1.2. Classification structurel des alcaloïdes

Les alcaloïdes ne constituent pas une catégorie définie de composés chimiques en raison de la variété de leurs structures moléculaires. À partir du 21^e siècle, ils sont catégorisés en fonction de leur structure chimique (**Ben Bordi and Hezla 2016**) :

➤ **Acyclique :**



3-Methyl-2-butenylguanidine

Figure 3: Structure chimique de galéguine.

➤ **Mono ou polycyclique :** Ils sont alors classés selon la structure du noyau hétérocyclique comme :

- ✓ **Les azines :** Pipéridine, nicotine.

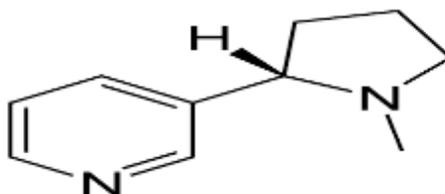


Figure 4: Structure chimique de nicotine.

- ✓ **Les Tropanes :** Atropine, hyoscyamine, scopolamine, cocaïne

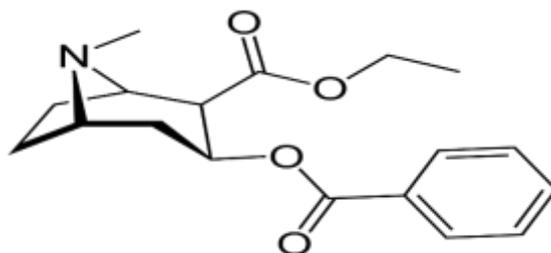


Figure 5: Structure chimique de cocaïne

- ✓ **Les quinoléines :** Quinoléine, quinine

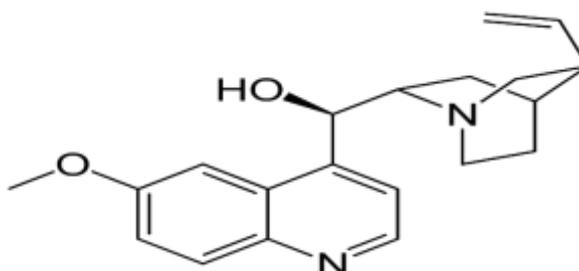


Figure 6: Structure chimique de cocaïne

- ✓ **Les isoquinolines :** Morphine, codéine.

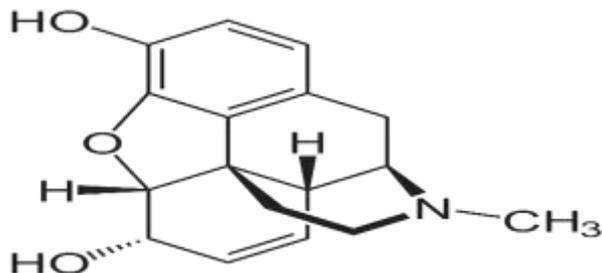


Figure 7: Structure chimique de morphine.

II.1.3. Propriétés physiques et chimiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées de masses très variables allant de 100 à 900 g/mol. La plupart d'entre eux sont des substances cristallines, de structure extrêmement variée, ils sont souvent solubles dans les solvants organiques et peu solubles dans l'eau, et l'inverse est souvent le cas. La basicité est très variable et dépend de la disponibilité du doublet libre de l'atome d'azote, elle permet l'union avec des acides minéraux comme les sulfates et les nitrates ou organiques comme les sulfamates et les tartrates pour former des sels (**Bruneton 2009**).

II.1.4. Propriétés thérapeutiques et médicinales des alcaloïdes

Les propriétés médicinales des alcaloïdes rendent ce groupe de métabolites secondaires particulièrement intéressant. Ces métabolites constituent la base scientifique de l'utilisation thérapeutique (**N'Guessan et al., 2009**). Au niveau du système nerveux central, ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine...). Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (**Bruneton 1999b**). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne) (**Kansole 2009**).

III. Hémolysse et activité anti-hémolytique

III.1. Hémolysse

III.1.1. Définition

L'hémolysse se réfère au processus visant à la destruction de la membrane érythrocytaire provoquant la libération d'hémoglobine (Hb) et d'autres composants associés aux dommages des globules rouges dans le plasma (**Shobana and Vidhya 2016**), s'ils ne sont pas neutralisés par des

mécanismes de protection innés, ils ont le potentiel d'activer de multiples voies inflammatoires. L'hème est l'un de ces modèles capables d'activer des voies d'inflammation convergentes telles que la signalisation des récepteurs Toll-like (TLR), la formation de pièges extracellulaires pour les neutrophiles et les autres molécules puissantes qui peuvent être libérées par les globules rouges au moment de leur rupture, notamment les protéines de choc thermique (HSP), comme Hsp70, l'interleukine-33 et l'Adénosine 5' triphosphate (**Mendonca et al., 2016**).

III.1.2. Types d'hémolyse

On peut distinguer deux types d'hémolyses, l'une est physiologique et l'autre est pathologique (hyper-hémolyse) (**Lippi et al., 2011**).

III.1.2.1. Hémolyse physiologique

L'hémolyse physiologique consiste en la destruction du globule rouge (GR) qui a atteint sa durée de vie maximale (120 jours). Le vieillissement naturel de la cellule entraîne des modifications biochimiques, morphologiques, conduisant à sa phagocytose par le système des phagocytes mononucléaires. Ce processus n'a aucune répercussion clinique ou biologique et se déroule principalement dans la moelle osseuse et, dans une moindre mesure, dans la rate, le foie et la circulation sanguine (**Kadali et al., 2016**).

III.1.2.2. Hémolyse pathologique

L'hémolyse pathologique ou hyper-hémolyse est le dépassement du processus physiologique de lyse des érythrocytes qui devient pathologique, ce phénomène est dû à une destruction excessive des globules rouges ou à un raccourcissement de leur durée de vie (**Kadali et al., 2016**). L'hyper-hémolyse peut se produire par l'introduction d'agents chimiques tels que certains médicaments, capables de modifier l'intégrité cellulaire en induisant des réorganisations et des changements morphologiques qui résultent d'une cascade d'effets partant de l'altération de la membrane lipidique conduisant finalement à la formation de sphérocytes et par conséquent à la lyse des hématies (**Manaargadoo-Catin et al., 2016, Portier et al., 2007**).

III.1.3. Action des anti-hémolytiques synthétiques

Les médicaments anti-hémolytiques tels que les suppléments de fer, la vitamine B12, les corticoïdes et aussi l'acide folique (vitamine B9) inhibent ou retardent la lyse des globules rouges (**Bachy 2015**).

III.1.4. Mécanismes physiologiques de maintien de l'intégrité de la membrane Erythrocytaire

Un équilibre entre le passage actif et passif des électrolytes à travers la membrane érythrocytaire permet le maintien du volume cellulaire de l'érythrocyte.

La pompe Ca^{2+} -ATPase, par exemple, maintient une concentration constante de Ca^{2+} entre 30 et 60 mM à l'intérieur de la cellule par rapport à une concentration extérieure de 1.8 mM.

En cas de dysfonctionnement de ce transport à travers la membrane du globule rouge, cela entraînera l'accumulation de ces ions à l'intérieur de la cellule, causant un grand nombre de pathologies dont la drépanocytose et des anémies hémolytiques.

Les globules rouges, de par leurs fonctions dans l'organisme, sont particulièrement exposés aux espèces réactives d'oxygène.

L'érythrocyte peut éliminer les électrons à l'origine de ce stress par le complexe PMRS (Plasma Membrane Redox System) et AFR réductase (Acrobate Free Radical), des complexes enzymatiques qui expulsent ces électrons vers le milieu extérieur (**Aguilar 2007**).

IV. Radicaux libres et activité antioxydante

L'oxygène est le premier élément essentiel pour la vie, responsable du fonctionnement normal de tout le système aérobie, mais l'oxygène peut être responsable d'un nombre de processus d'oxydation suivis de mauvaises conséquences comme le stress oxydatif (**Saito et al., 2013**).

IV.1. Radicaux libres

Un radical est une molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur ses orbitales électroniques externes. La présence d'un électron célibataire confère souvent à ces molécules la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus essentiellement non spécifiques, leur durée de vie en solution est très courte (**Amzal 2010**).

Quand l'oxygène interagit avec certaines molécules, des radicaux libres sont formés, ils sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants avant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité (**Hebrard 2010**).

Nous pouvons citer quatre types de radicaux libres tels que ; l'anion radicalaire carbonate ($\text{CO}_3^{\cdot-}$), l'oxygène moléculaire (O_2), l'anion super-oxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH) (**Rolland 2004, Favier 2003**).

IV.2. Stress oxydatif

Le phénomène du stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité de l'organisme à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire.

Cette évolution est produite par plusieurs facteurs tels que la carence nutritionnelle en antioxydants comme la vitamine E, la vitamine C et les oligo-éléments. Ce processus est également dû à d'autres facteurs pro-oxydants comme l'alcool, les métaux, le tabac, ainsi qu'à une diminution des antioxydants (**Barouki 2006**).

IV.2.1. Les pathologies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans le développement de plusieurs pathologies humaines. La relation entre les maladies et le type du stress oxydant est représentée dans le **tableau II (Favier 2006)**.

Tableau II : Relations entre les maladies et le stress oxydant (Favier 2006).

Type de stress oxydant	Maladie
Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale	Cancers, auto-immunité, cataracte, dégénérescence musculaire, sclérose latérale amyotrophique, photo-vieillessement cutané, photosensibilisation, hémochromatose
Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Granulomatose septique, psoriasis
Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladie d'Alzheimer, stérilités masculines, maladies virales : EBV, HVB, rhumatismes, athérome, insuffisance respiratoire

IV.3. Les antioxydants

IV.3.1. Définition

Les antioxydants sont des composés qui peuvent inhiber ou retarder l'oxydation des lipides et d'autres biomolécules. Ils interdisent le début d'une réaction en chaîne oxydante par des radicaux ou éteignent la propagation. Ces réactions peuvent causer des dommages fonctionnels au corps humain, comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Les antioxydants peuvent empêcher ce processus en raison de leurs propriétés redox comme le comportement réducteur, le don d'hydrogène ou l'extinction de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (Wollinger *et al.*, 2016). Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Orban *et al.*, 2011) en:

- **Antioxydants naturels** : tels que les métabolites secondaires (polyphénols), les métabolites primaires (protéine, lipides).
- **Antioxydants enzymatiques** : synthétisés par l'organisme à Action directe (Catalases, Glutathion peroxydase, super oxyde dismutase).
- **Antioxydants synthétiques** : tels que Le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA).

IV.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants

Plusieurs types de molécules à activité antioxydante sont présents dans l'organisme, avec des mécanismes d'action différents, et ils peuvent également agir à différents stades d'une séquence oxydative. Les antioxydants ont la capacité d'éliminer ou de diminuer les concentrations locales d'oxygène, d'éliminer les ions des métaux catalytiques (cuivre, fer,...), de neutraliser les radicaux initiateurs, de provoquer la rupture de l'ordre de la chaîne d'oxydation, de réparer les dommages oxydatifs et de promouvoir les dommages excessifs de l'ADN pour empêcher leur transformation (Amzal 2010)

On peut signaler deux modes d'action des antioxydants :

- **Système de défense primaire** : on a l'exemple de glutathion peroxydase et la catalase qui préviennent la production de (FAO) ; la forme active de l'oxygène en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation (Halliwell 1999)
- **Système de défense secondaire** : C'est un système de protection contre les conséquences de l'oxydation des biomolécules, comme la dégradation des protéines dénaturées par le protéasome, l'intervention de ligase et l'endonucléases au niveau de l'ADN qui prévient la cancérisation de la cellule (Wollinger *et al.*, 2016).

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée sur la coque des graines de *Pinus pinea* L. achetées sur un marché locale de la ville de Blida.

I.2. Sang

Le sang utilisé pour préparer les suspensions cellulaires afin d'évaluer l'activité anti-hémolytique a été prélevé sur de sujets sains à l'hôpital Amar OUAMRANE de Lakhdaria, le sang a été recueilli dans des tubes héparinés et transporté au laboratoire dans une glacière à 4°C.

I.3. Réactifs et solvants

Les solvants et réactifs utilisées pour l'extraction et l'évaluation des activités antioxydantes et anti-hémolytiques sont de grade analytique.

Les solvants organiques (éthanol et chloroforme) ont été fournis de *Sigma-aldrich*. Les réactifs chimiques, acides et sels sont : ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique), ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$), persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), trichloracétique acide (TCA), acide ascorbique, acide salicylique, acide chlorhydrique (HCl), BHA (ButylHydroxyAnisole), BHT (ButylHydroxyToluène), $FeCl_3$, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , hydroxyde de sodium (NaOH) ont été fournis de *Sigma-Aldrich*, *Biochem* et *prolabo*.

II. Méthodes

II.1. Préparation de la poudre végétale

Les graines de *Pinus pinea* ont été nettoyées avec de l'eau distillée puis décortiquées. Les coques ont été nettoyées une seconde fois et séchées à l'air libre. Les coques propres et sèches ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine, puis tamisée à travers un tamis de 200 μm et stockée dans des récipients hermétiques jusqu'à son utilisation. La poudre ainsi obtenue a une couleur brune plus au moins intense.

II.2. Extraction assistée par ultrasons des alcaloïdes

➤ Principe de l'extraction

L'extraction assistée par ultrasons est cependant une méthode efficace pour extraire des composés bioactifs des plantes (**Wang and Weller 2006**). Cette méthode est attribuée à la pression de la propagation des ondes ultrasonores et aux phénomènes de cavitation qui en résultent. Les puissantes forces de cisaillement augmentent le transfert de masse des matières extractibles. L'impact par ces micro-jets entraîne l'écaillage, la détérioration et destruction des particules. Cet

effet permet d'exposer de nouvelles surfaces et d'augmenter le transfert de masse. Pendant le processus d'extraction, la cavitation peut favoriser la pénétration du solvant et détruire les membranes cellulaires lorsque des intensités élevée sont appliquées (**Ji et al., 2006, Li et al., 2004, Shotipruk et al., 2001**).

➤ Mode opératoire

Le protocole d'extraction a été décrit par **Aguilar-Hernández et al., (2020)** en y apportant quelques modifications. Une masse de 2 g de poudre de la coque de *P. pinea* a été placée dans un bécher avec 15 ml d'éthanol, puis le bécher a été émergé dans un bain à ultrasons et irradié pendant 10 min à 25°C. Après extraction, le mélange a été centrifugé à 8000 g pendant 15 min et le surnageant a été recueilli et dilué avec 10 ml d'éthanol et 5 ml d'HCl à 5% ont été ajoutés.

Les échantillons ont été agités modérément pendant à 4h à température ambiante, puis laissés au réfrigérateur (4°C) pendant une nuit. Les extraits ont été filtrés, placés sur de la glace et leur pH a été ajusté à 10.0 avec NaOH 6M. Enfin, du chloroforme a été ajouté aux échantillons à un rapport de 1:2 (échantillon : chloroforme). Après décantation, la phase organique a été récupérée et séchée dans une étuve à 40°C.

II.3. Le rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des extraits obtenus est définit comme étant le rapport entre la masse des extraits bruts à l'état sec et celle de la matière végétale utilisée.

Le rendement d'extraction de chaque extrait sec a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\% \text{ Rendement d'extraction} = [(P1-P0) / P] \times 100$$

Où :

P0 : Poids de flacon vide.

P1 : Poids de flacon avec l'extrait après évaporation (Extrait sec).

P : Poids de poudre initial.

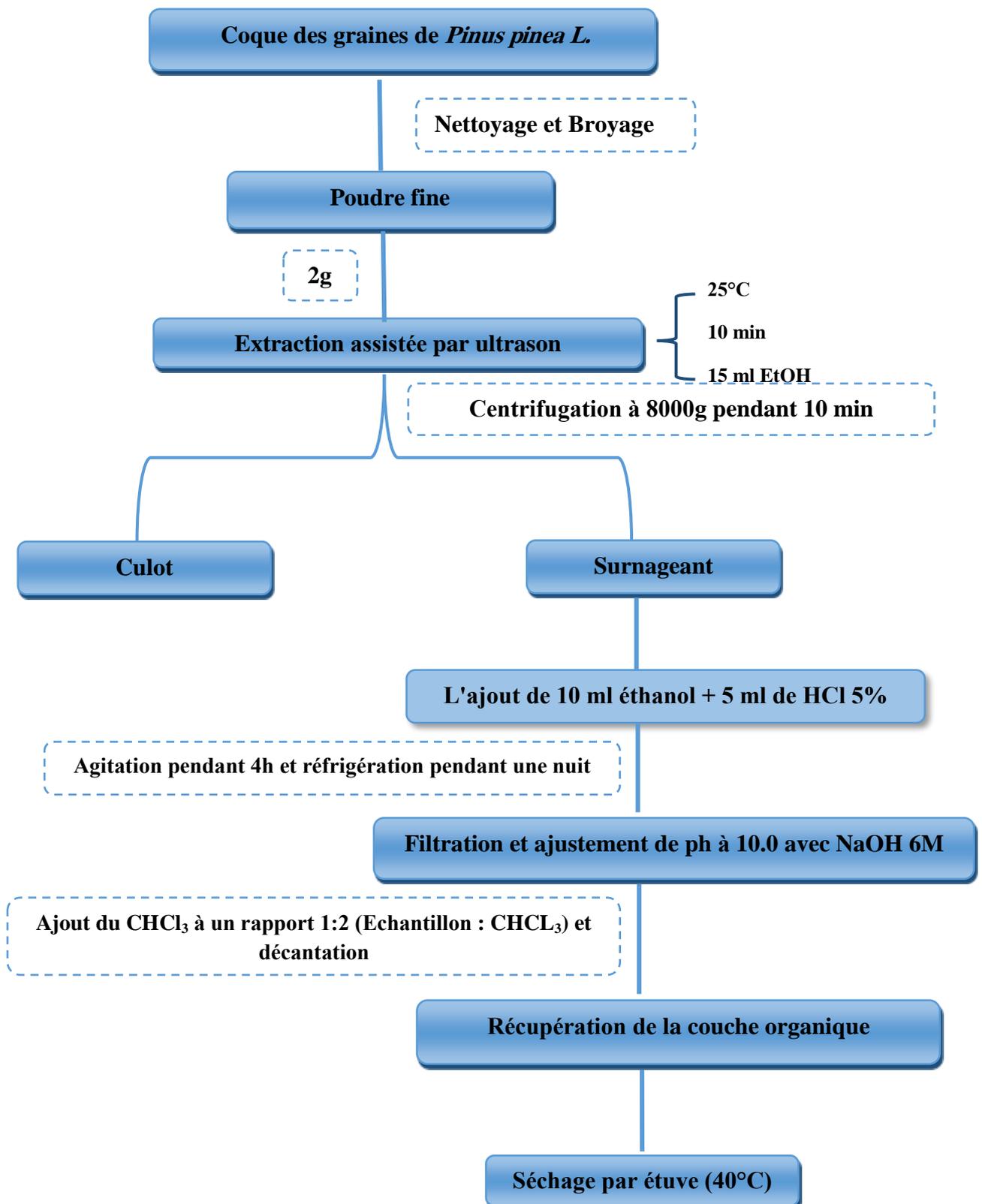


Figure 8 : Schéma récapitulatif de l'extraction des alcaloïdes à partir de la coque des graines de *P. pinea* L. (Aguilar-Hernández *et al.*, 2020).

II.4. Evaluation des activités biologiques

II.4.1. Etude de l'activité antioxydante de l'extrait alcaloïdique

Il existe plusieurs méthodes afin d'évaluer *in vitro* l'activité antioxydante des extraits. Dans la présente étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante de l'extrait alcaloïdique a été réalisée par le test de piégeage du radical libre ABTS et le test de la réduction de fer (FRAP).

II.4.1.1. piégeage du radical libre ABTS

➤ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical cationique ABTS^{•+}. En réagissant avec le persulfate de potassium, l'ABTS forme le radical ABTS^{•+}, de couleur bleu verte sombre. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoque la décoloration du mélange (Beddou 2015).

➤ Mode opératoire

La capacité de l'extrait alcaloïdique à piéger le radical ABTS a été réalisée comme décrit par **Re *et al.*, (1999)** avec quelques modifications. La solution mère d'ABTS contenait 7mM d'ABTS et 2,45 mM de persulfate de potassium, dissous dans de l'eau distillée. La solution a ensuite été laissée à incuber pendant 16 h à l'obscurité et à température ambiante. Ensuite, une solution fraîche a été préparée en diluant 2 ml de solution mère dans 200 ml d'éthanol absolu pour obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm.

Un volume de 25µl de chaque concentration (1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml) a été ajouté à 750 µl de solution ABTS fraîchement préparée. Après 10 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance du mélange a été déterminée à 734 nm. L'activité de l'extrait a été comparée à celle des antioxydants synthétiques (Acide ascorbique, BHT et BHA).

➤ Expression des résultats

L'activité antioxydant a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition du ABTS (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_1] \times 100$$

Où :

A0 : Absorbance du control (sans extrait).

A1 : Absorbance du test (avec extrait ou standard).

L'IC50 utilisée comme une estimation de l'activité antioxydante a été déterminée à partir de la courbe de variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

II.4.1.2. Le pouvoir réducteur de fer (FRAP)

➤ Principe

Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferrique (Fe^{2+}) (**Beddou 2015**). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical Hydroxyle par la réaction de Fenton (**Dudonne et al., 2009**).

➤ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur du fer de l'extrait alcaloïdique a été déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)** avec quelques modifications. Un volume de 80 μl de chaque concentration (1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml) a été mélangé avec 250 μl de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 250 μl d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% (m/v). L'ensemble obtenu a été incubé à 50°C pendant 20 min, puis 250 μl d'acide trichloracétique (TCA) à 10% ont été ajoutés pour stopper la réaction suivie par une centrifugation à 3000 rpm pendant 10min. un volume de 500 μl de surnageant de chaque tube ont été additionné au 500 μl d'eau distillée et 100 μl de chlorure de fer (FeCl_3) à 0,1%. L'absorbance du milieu réactionnel a été déterminé à 700 nm.

➤ Expression des résultats

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Beddou 2015**). L'activité de l'extrait alcaloïdique a été comparée à celle de l'acide ascorbique, BHT et BHA.

II.4.2. Etude de l'activité anti-hémolytique de l'extrait alcaloïdique

L'étude de la protection de la membrane érythrocytaire présente un intérêt crucial dans le traitement de certaines pathologies hémolytiques. L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de l'extrait alcaloïdique de de la coque es graines de *P. pinea* L. à prévenir l'hémolyse des globules rouges humains, induite par un stress osmotique et thermique.

II.4.2.1 Préparation de la suspension érythrocytaire

Le sang collecté a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min pour séparer les érythrocytes d'autres éléments consécutifs du sang. Le plasma a été retiré et le culot érythrocytaire été lavé 3 fois avec du tampon phosphate (PBS) (pH 7,5, NaCl 0,9%) et une suspension érythrocytaire à 2% (GR : PBS) a été préparé avec du PBS.

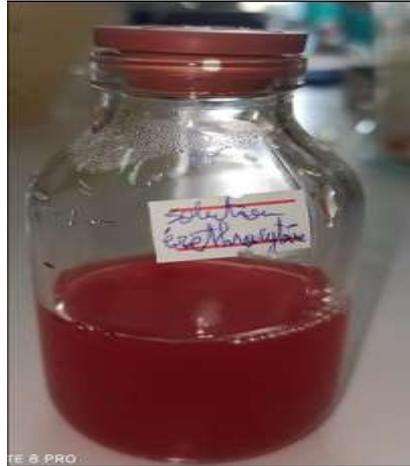


Figure 9: Solution érythrocytaire

II.4.2.2 Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique

L'exposition de l'érythrocyte à un stress hypotonique entraîne la lyse de sa membrane, qui s'accompagne par la libération de l'hémoglobine. Le test qui suit apprécie l'effet protecteur de l'extrait alcaloïdique vis-à-vis des cellules érythrocytaires ayant subi un stress osmotique par une variation des concentrations en NaCl (0,5, 0,7, 0,9 %).

➤ Mode opératoire

L'activité protectrice de l'extrait vis-à-vis de l'hémolyse induit par un stress osmotique a été évaluée selon la méthode décrite par **de Freitas *et al.* (2008)** avec quelques modifications. Un volume de 3 ml de la suspension érythrocytaire à 2 % a été mélangé avec 3 ml du tampon phosphate salin (pH 7,5) supplémentées avec de concentrations variables en NaCl (0,5, 0,7, 0,9 %), où chacune est combinée à des concentrations variables de l'extrait (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 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 a été 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 l'extrait alcaloïdique.

➤ Expression des résultats

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

$$\text{Inhibition d'hémolyse (\%)} = [(A1-A2) / A1] \times 100$$

Où :

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

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

II.4.2.3 Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique

L'évaluation de l'activité protectrice de l'extrait vis-à-vis de l'hémolyse induite par un stress thermique est réalisée *in vitro* par la méthode spectrophotométrique décrite par **Sakat *et al.*, (2010)**.

Un volume de 3ml de différentes concentrations de l'extrait (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg/ml) préparées dans un tampon phosphate salin (pH 7,4 ; NaCl 0,9 %) a été mélangé avec 3ml de suspension érythrocytaire à 2 %, le mélange réactionnel a été incubé à 56°C pendant 30 min. Après incubation, les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 2000 rpm et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm.

L'effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique a été comparé à celle de l'acide salicylique utilisée comme un anti-hémolytique de référence.

➤ Expression des résultats

La protection contre l'hémolyse induite par la chaleur est calculée par l'équation suivante :

$$\text{Protection (\%)} = [100 - (A_{\text{ech}}/A_{\text{contrôle}})] \times 100$$

Où :

A_{ech} : Absorbance de l'extrait.

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du contrôle positif où l'eau physiologique a été remplacée par de l'eau distillée, ce qui a provoqué une hémolyse totale.

Résultats et Discussion

I. Rendement d'extraction des alcaloïdes

Différentes méthodes d'extraction des alcaloïdes sont reportées dans la littérature. Dans la présente étude, l'extraction assistée par ultrasons des alcaloïdes de la coque des graines de *P. pinea* L. a été utilisée.

Le rendement d'extraction correspond à la masse d'extrait après séchage. Il est reporté à la masse initiale de l'échantillon soumis à l'extraction et exprimé en pourcentage. Le rendement d'extraction de l'extrait alcaloïdique après différentes étapes d'extraction est de $0,83 \pm 0,117$ %. En comparant ces résultats avec ceux obtenus par **Virjamo and Julkunen-Tiitto (2018)**, leurs résultats étaient bien plus élevée que ceux obtenus dans notre étude, le rendement des alcaloïdes trouvés dans les aiguilles et l'écorce de *P. sylvestris* était de 25%. Cependant, un rendement de 0,93% a été obtenu pour la plante *Fumaria officinalis* (**Suau et al., 2004**), ce qui est beaucoup plus proche du rendement de la coque.

La différence entre les rendements d'extraction des alcaloïdes entre différentes espèces de plantes peut être due à plusieurs facteurs physico-chimiques, le moment de la récolte peut également jouer un rôle important dans le rendement d'extraction. La taille homogène de la poudre fine peut également influencer le rendement d'extraction, la forme fine de la poudre permet une meilleure interaction entre le solvant et la surface des particules. Cette différence peut également être due à la nature du solvant d'extraction utilisé, dont l'extraction avec du méthanol / eau (v/v) donne un meilleur rendement (**Bate-Smith 1968**).

II. Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait alcaloïdique de la coque des graines de *P. pinea* L. a été évaluée par le test de piégeage du radical libre ABTS et le pouvoir de réduction de fer.

II.1. Activité anti-radicalaire ABTS⁺

Le profil d'activité anti radicalaire obtenu révèle que l'extrait alcaloïdique possède une activité anti-radicalaire. Les résultats de l'activité anti-radicalaire obtenue pour l'extrait, acide ascorbique, BHA et BHT sont représentés dans la **figure 11** et **Annexe 1** et **Annexe 2** respectivement.

D'après les résultats présentés dans la **figure 11** et les **annexe 1** et **2**, nous observons que le pourcentage d'inhibition (PI) du radical ABTS, que ce soit pour l'extrait, BHA, BHT ou

l'acide ascorbique, évolue en fonction des concentrations. Le pourcentage d'inhibition de l'extrait alcaloïdique a atteint une valeur de $91,347 \pm 0,093$ % à une concentration de 10 mg/ml, tandis que le BHA et le BHT à une concentration de 1 mg/ml ont atteint un PI de $99,515 \pm 0,110$ % et $99,427 \pm 0,076$ %, respectivement. L'acide ascorbique a atteint une valeur de $84,7 \pm 1,764$ % à une concentration de 0,08 mg/ml.

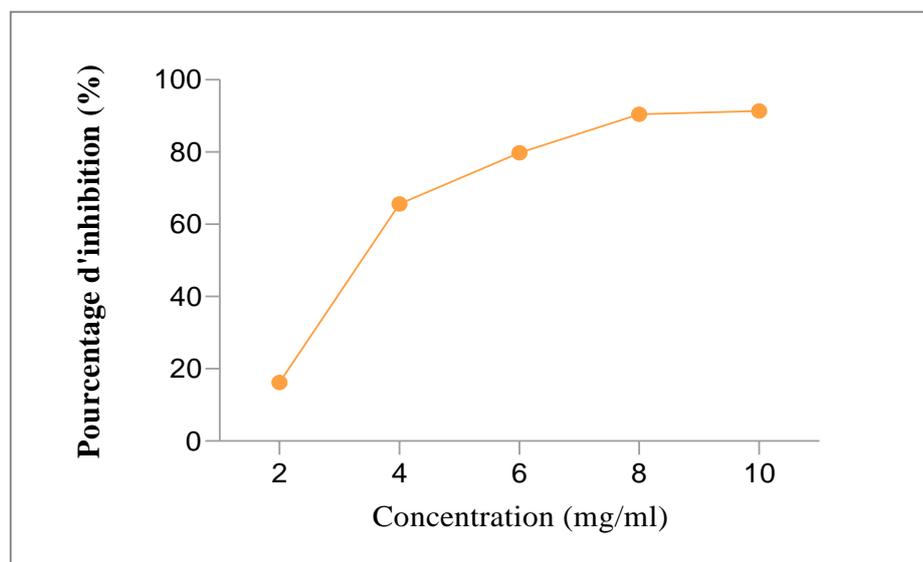


Figure 10 : pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS en fonction des différentes concentrations de l'extrait alcaloïdique.

Belyagoubi-Benhammou *et al.*, (2014) ont rapporté un PI de 65,13 % pour l'extrait alcaloïdique des rameaux d'*Anabasis articulata* à une concentration de 4 mg/ml. De même, l'extrait alcaloïdique de *Anabasis. aphylla* a eu une bonne activité comme l'a rapporté **Shakeri *et al.*, (2012)**, la capacité de piégeage du radical ABTS était de 81,8 %.

L'IC50, est un paramètre récemment introduit pour l'interprétation des résultats obtenues par la méthode du ABTS. Elle est définie comme étant la concentration du substrat nécessaire pour la réduction de 50% du radical ABTS (**Molyneux 2004**).

En estimant l'IC50, l'extrait de la coque de graines de *P. pinea* L. est très peu efficace par rapport aux antioxydants synthétiques (**tableau III**). Nous rapportons que l'IC50 de l'extrait a une valeur de 3,368 mg/ml qui est beaucoup plus inférieure que celles obtenues pour l'acide ascorbique, BHA et BHT ayant des valeurs de 0,056, 0,085 et 0,1 mg/ml, respectivement.

Tableau III : Le pouvoir antioxydant de l'extrait alcaloïdique et des antioxydants synthétiques exprimés en mg/ml.

Tableau III : Le pouvoir antioxydant de l'extrait alcaloïdique et des antioxydants synthétiques exprimés en mg/ml.

	Alcaloïdes	Acide ascorbique	BHT	BHA
IC50 (mg/ml)	3,368	0,056	0,1	0,081

Les résultats indiquent que les alcaloïdes de la coque de *P. pinea* L. ont des propriétés redox leur permettant d'agir en tant qu'agents donateurs d'hydrogène et d'électron. Ainsi, le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait alcaloïdique peut s'expliquer par le faite que la coque des graines de *P. pinea* L. est riche en différentes types d'alcaloïdes et la synergie entre ces derniers est responsable de cette activité. De même, **Gan et al., (2017)** ont signalé que l'activité antioxydante était corrélée aux alcaloïdes de *Lepidium meyenii*.

II.2. Pouvoir réducteur (FRAP)

L'activité antioxydante a été évaluée par la technique de réduction du fer FRAP, qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydants des plantes (**Kranl et al., 2005**).

Dans ce test, nous avons mesuré le potentiel réducteur à travers la réduction du complexe Fe^{3+} en forme ferreux Fe^{2+} qui s'est traduit par une couleur bleu. L'absorbance du mélange est proportionnelle à l'intensité de la couleur (**Wojdyło et al., 2007**).

La **figure 12** représente le pouvoir réducteur de l'extrait alcaloïdique en fonction de sa concentration.

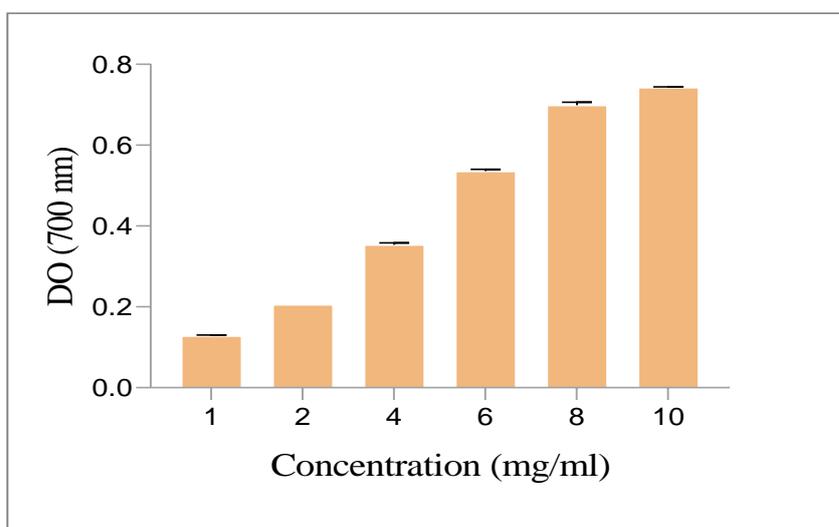


Figure 11: Pouvoir réducteur de l'extrait alcaloïdique en fonction de la concentration

Le pouvoir réducteur de l'extrait alcaloïdique est expliqué par l'augmentation de l'absorbance mesurée à 700 nm. D'après la **figure 12**, on observe que l'absorbance de l'extrait augmente avec la concentration, atteignant une valeur de $0,743 \pm 0,0014$ à une concentration de 10 mg/ml.

En comparant le pouvoir réducteur des antioxydants synthétiques à celui de l'extrait alcaloïdique, leur capacité à réduire le fer est plus efficace que celle de l'extrait testé. Nous rapportons qu'à une concentration de 0,8 mg/ml, l'absorbance du BHA et BHT était de $2,4905 \pm 0,158$ de $0,570 \pm 0,004$, respectivement (**Annexe 4**). Tandis que l'acide ascorbique avait une absorbance de $0,386 \pm 0,0021$ à une concentration de 0,1 mg/ml (**Annexe 3**) alors que l'extrait alcaloïdique avait une absorbance de $0,1285 \pm 0,0021$ à une concentration de 1 mg/ml.

La capacité de l'extrait alcaloïdique à réduire le fer suggère la présence de molécules réductrices. Ces résultats suggèrent que l'extrait a plusieurs propriétés antioxydantes. Également, la propriété antioxydante de l'extrait alcaloïdique de la coque des graines *P. pinea* L. peut être due à la protopine qui est l'une des constituants chimiques majeurs et est partagée par le berberine qui est rapporté comme des constituants majeurs responsables de l'activité antioxydante (**Noureddine et al., 2013**).

III. Evaluation de l'activité anti-hémolytique

L'effet anti-hémolytique des extraits de *Pinus pinea* L. a été évalué *in vitro* afin de démontrer l'effet protecteur de cet extrait sur la préservation de l'intégrité cellulaire, qui est essentiellement liée aux membranes des globules rouges.

III.1. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique

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

L'entrée massive d'eau dans l'hématite conduit à son gonflement puis à sa rupture et à la libération de son contenu cytoplasmique, en particulier l'hémoglobine, c'est le phénomène d'hémolyse.

L'influence de l'extrait alcaloïdique de *Pinus pinea* L. sur la lyse osmotique des globules rouges est déterminée en mesurant l'inhibition de l'hémolyse à des concentrations

croissantes de solutions salines. Ce test a été effectué en utilisant NaCl comme hémolyseur à différentes concentrations en l'absence et en présence de l'extrait.

Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans la figure x. nous notons une croissance proportionnelle entre la concentration de l'extrait et le pourcentage de protection d'hémolyse induite par toutes les concentrations salines utilisées (0,5, 0,7, 0,9 %).

La valeur de protection maximale contre l'hémolyse induite par le NaCl a été enregistrée à 1 mg/ml pour chaque concentration de NaCl. A partir de la **figure 13**, nous observons que de à NaCl 0,9%, la protection était la plus élevée ($60 \pm 0,692$ %), suivie par 0,7 % ($58,61 \pm 0,480$ %) et 0,7 % ($59,29 \pm 1,172$ %).

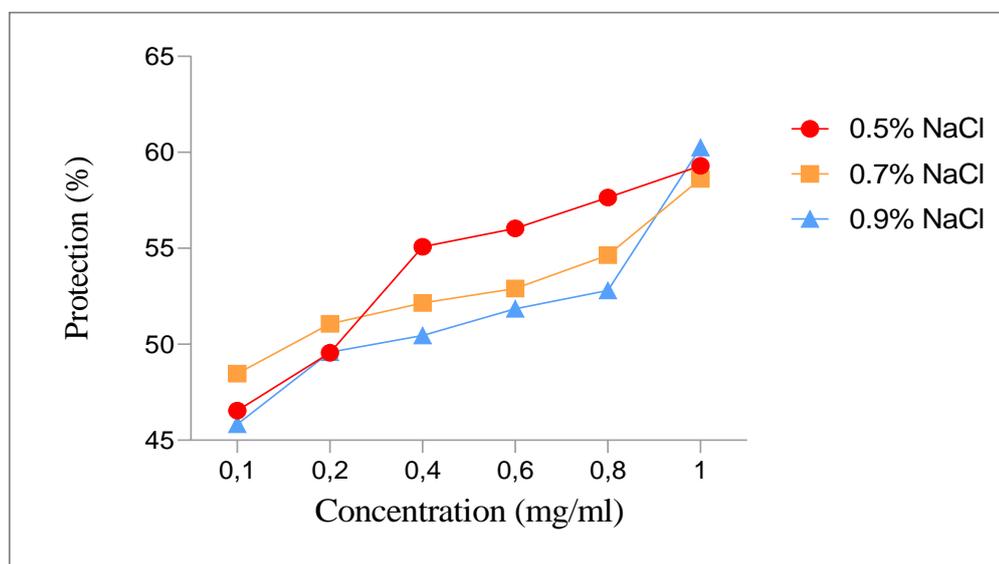


Figure 12: l'effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique induit par 0,5, 0,7 et 0,9 % du NaCl.

L'effet protecteur de l'acide salicylique utilisé comme un anti-hémolytique de référence montre la même évolution que celui de l'extrait (**figure 14**). Comme pour l'extrait, la protection de l'acide salicylique contre l'hémolyse augmente avec la concentration, cependant, l'effet protecteur de l'acide salicylique est beaucoup plus élevé que celui de l'extrait à l'exception du NaCl 0,9%, l'effet protecteur de l'acide salicylique varie de $88,366 \pm 1,265$ % à $83,44 \pm 2,214$ % pour le NaCl à 0,5 % et 0,7 %, respectivement. L'effet protecteur de l'acide salicylique contre l'hémolyse induite par NaCl à 0,9% est de $53,02 \pm 3,480$ %.

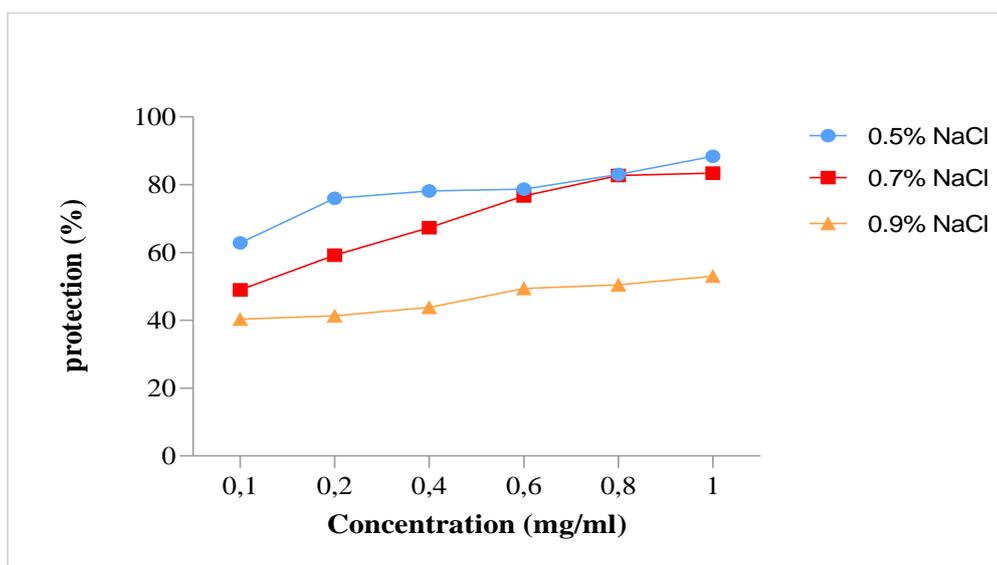


Figure 13: L'effet protecteur de l'acide salicylique vis-à-vis d'un stress osmotique induit par 0,5, 0,7 et 0,9 % du NaCl.

Il a été démontré que l'incorporation des métabolites secondaire dans la membrane des érythrocytes améliore la stabilité de ces dernières contre la lyse hypotonique. Cette propriété peut s'expliquer par l'augmentation du rapport volume/surface des cellules qui pourrait être obtenu soit par l'expansion de la membrane ou le rétrécissement de la cellule (**Chopade et al., 2012**).

III.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique

L'effet stabilisant de l'extrait étudié face à la lyse érythrocytaire induite par la chaleur est illustré dans la figure 14. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de protection par rapport à la concentration d'extrait utilisé et comparés à un anti-hémolytique e référence (acide salicylique).

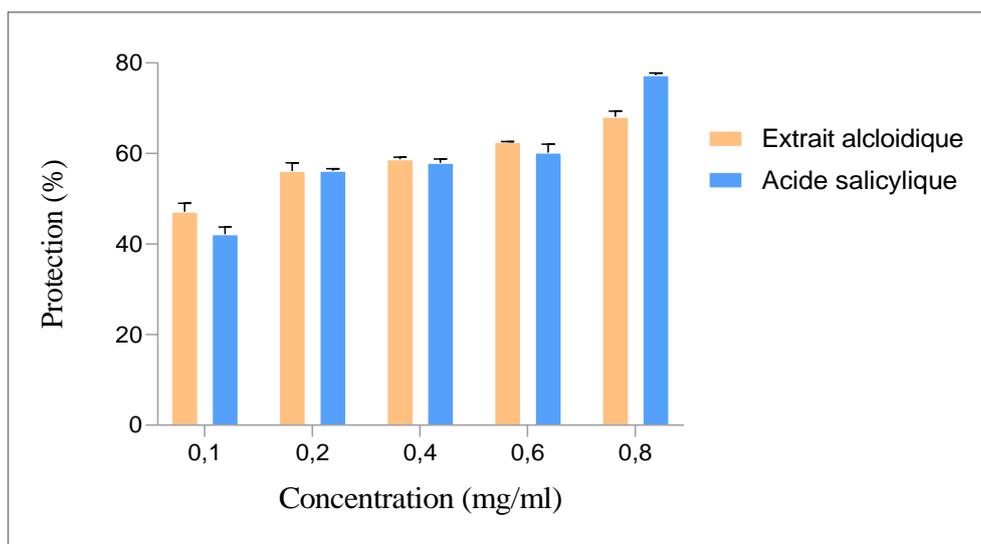


Figure 14: L'effet protecteur de l'extrait et de l'acide salicylique vis-à-vis d'un stress thermique.

Les résultats obtenus montrent que les pourcentages de protection sont proportionnels à l'augmentation des concentrations de l'extrait alcaloïdique. Pour des concentrations allant de 0,1 à 0,8 mg/ml l'extrait a montré une activité anti-hémolytique importante et dose dépendante, avec des pourcentages de protection allant de $(47,12 \pm 1,894$ à $68,124 \pm 1,198$ %). Ces données sont comparables à celles de l'acide Salicylique ($42,5 \pm 1,615$ à $77,26 \pm 0,501$ %), ce qui confirme le potentiel de l'extrait alcaloïdique des graines étudiées comme un agent anti-hémolytique.

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 (**Gershfeld and Murayama 1988**). L'effet protecteur contre la lyse érythrocytaire induite par la chaleur peut s'expliquer par l'interaction de l'extrait avec les protéines membranaires inhibant ainsi leur dénaturation (**Lepock et al., 1989**).

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

*Conclusion générale et
perspective*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le règne végétal est une source inépuisable de molécules qui peuvent présenter un intérêt thérapeutique et l'étude des activités biologiques des plantes médicinales a augmenté considérablement ces dernières années et cela dans divers pays notamment en Algérie. Notre étude est consacrée à l'extraction des à partir de la coque de pin obtenus par une méthode conventionnelle « extraction par ultrason ». Le rendement en alcaloïdes a été $0,83 \pm 0,117$ %.

L'objectif principal de ce travail consistait à l'évaluation de l'activité anti-oxydante et anti-hémolytique d'un extrait actif de la plante médicinales « *Pinus pinea* L. »

Le potentiel anti radicalaires de l'extrait de la coque de pin a été déterminé par la méthode anti radicalaire ABTS*+ et la méthode de pouvoir réducteur dont les résultats montrent que ces extrais possèdent une bonne activité antioxydante, donc la coque contient des molécules considérées comme des agents antioxydants potentiels.

Le taux d'inhibition de radical ABTS*+ a été estimée à un pourcentage de $91,347 \pm 0,093$ % à 10mg/ml. Et son concentration inhibitrice (IC50) est de 3,368 (mg/ml) ce qui signifie une bonne activité inhibitrice de nos alcaloïdes. Tandis que leurs capacité à réduire le fer est moins importante son absorbance a été mesurer à $0,1285 \pm 0,0021$ à une concentration de 1 mg/ml.

Dans un second volet de notre étude on s'intéresse au pouvoir anti-hémolytique réalisé par deux méthodes qui a été relevée à différentes concentrations en extrait. Cette étude a montré que l'extrait de plante ne provoque qu'une hémolyse modérée avec des pourcentages compris entre 0,5 %, 0,7 %, 0,9%. Pour ce qui est de l'activité anti-hémolytique, les résultats montrent que l'extrait possède un effet protecteur relativement important vis-à-vis de l'hémolyse induite par un stress osmotique qui a été estimée à un pourcentage de $60 \pm 0,692$ % à une concentration en NaCl de 0,9 %, tandis que les pourcentages de protection de l'hémolyse induite par un choque thermiques a été estimée à $68,124 \pm 1,198$ %. Nous pouvons dire ainsi que l'extrait exprime un effet stabilisateur de la membrane du globule rouge

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs, connues par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude antioxydant et anti-hémolytique nous permet de conclure que les coques de pin sont de bonne source en antioxydants.

Conclusions générale et perspectives

Notre pays possède une biodiversité immense de plantes médicinales qui se caractérise par un réservoir assez important de métabolites avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demande :

- De déterminer des nouvelles substances naturelles pourront répondre aux différents problèmes de santé et d'être une alternative des médicaments synthétiques.
- D'être plus exploitées par les chercheurs et faire des études biochimiques sur des plantes notamment le genre *Pinus*.
- De développer des médicaments anti radicalaires à base de plantes doués d'une activité antioxydant et anti-hémolytique.

Références bibliographiques

Références bibliographique

- 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
- Aguilar-Hernández, G., Zepeda-Vallejo, L. G., García-Magaña, M. d. L., Vivar-Vera, M. d. I. Á., Pérez-Larios, A., Girón-Pérez, M. I., Coria-Tellez, A. V., Rodríguez-Aguayo, C. & Montalvo-González, E. (2020). Extraction of alkaloids using ultrasound from pulp and by-products of soursop fruit (*Annona muricata* L.). *Applied Sciences*, **10**, 4869.
- Aguilar, M. (2007). Erythrocytes -MB7. In: Faculté de Médecine. Montpellier, France.
- Amri, I., Gargouri, S., Hamrouni, L., Hanana, M., Fezzani, T. & Jamoussi, B. (2012). Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of pest science*, **85**, 199-207.
- Amzal, H. (2010). Etude de l'activité antioxydante des saponines de l'arganier.
- Aniszewski, T. (2007). Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier.
- Bachy, E., Houot, R., Dony, A (2015). Hématologie adulte et pédiatrique, Onco Hématologie (Ellipses). 44-46.
- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences*, **22**, 266-272.
- Bate-Smith, E. (1968). Les Composés phénoliques des Vegetaux: P. Ribereau-Gayon, Dunod, Paris, 1968. 254 pp., 56 Fr. Pergamon.
- Beddou, F. (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur.: Université Abou bekr Belkaid, Tlemcen.
- Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L. & Bekkara, F. A. (2014). Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, **8**, 1198-1207.
- Belyagoubi, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. In: Département de Biologie « Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) ». Pp. 109. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. .
- BEN BORDI, A. & HEZLA, M. (2016). Contribution à l'étude d'une plante toxique la Stramoine (*Datura stramonium*L.) dans la Wilaya D'El OUED.

- Boudy, P. (1950). Economie forestière Nord-africaine-Tome 2: monographies et traitements des essences forestières.
- Bruneton, J. (1999a). Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Paris.
- Bruneton, J. (1999b). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. *Lavoisier, Paris*, **1120**.
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (p. 1292). *Paris: Tec & Doc Lavoisier*.
- Calama, R., Cañadas, N. & 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.
- Chopade, A. R., Somade, P. M. & Sayyad, F. J. (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.
- de Freitas, M. V., Rita de Cássia, M. N., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M. T., Costa, J. O., Firmino, C. B. & Penha-Silva, N. (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, **22**, 219-224.
- DEROUECHE, H. (2015). Télédétection et analyse des dépérissements des forêts Naturelles en zone semi-aride (Djelfa). 2015.
- Donatien, C. (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes-extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols : Etude de leur activité antioxydante.: Université de Bamako.
- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 1768-1774.
- Fady, B. (2005). Biodiversité des populations de conifères: existe-t-il une spécificité méditerranéenne? : Université Paul Cézanne-Aix-Marseille III.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 108-115.
- Favier, A. (2006). [Oxidative stress in human diseases]. *Ann Pharm Fr*, **64**, 390-6.

- Feikh (2014). Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en algérie. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
- Gan, J., Feng, Y., He, Z., Li, X. & Zhang, H. (2017). Correlations between antioxidant activity and alkaloids and phenols of maca (*Lepidium meyenii*). *Journal of Food Quality*, **2017**.
- Gausсен, H. (1930). La carte des productions végétales. In: Annales de géographie. Pp. 337-358. JSTOR.
- Gershfeld, N. L. & Murayama, M. (1988). Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: temperature dependence of hemolysis. *The Journal of membrane biology*, **101**, 67-72.
- Halliwell, B. (1999). Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends in biochemical sciences*, **24**, 255-259.
- Hebrard, M. (2010). Etude des systèmes antioxydants dans le métabolisme et la virulence de *Salmonella typhimurium*. Aix-Marseille 2.
- Iserin, P., Masson, M. & Restellini, J.-P. (2007). Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse.
- Ji, J.-b., Lu, X.-h., Cai, M.-q. & Xu, Z.-c. (2006). Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, **13**, 455-462.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A. & Stevens, P. (2002). Botanique systématique: une perspective phylogénétique. De Boeck Supérieur.
- Kadali, V. N., Ramesh, T., Pola, S. R., Sandeep, B. & Divakar, T. (2016). Evaluation of anti hemolytic activity, antibacterial activity and phytochemical investigation of *Acalypha indica* methanolic leaf extract. *Evaluation*, **1**.
- Kadri, N. (2014). GRAINES DE PINUS SP.: CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE.
- Kadri, N. & khetta, B. (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.
- Kansole, N. M. R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activité biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. In: Sciences Biologiques Appliquées. Burkina Faso.

- Karaali, D., Gumussoy, C. A. & Calisir, F. (2011). Factors affecting the intention to use a web-based learning system among blue-collar workers in the automotive industry. *Computers in Human Behavior*, **27**, 343-354.
- Karou, D., Dicko, M. H., Simpore, J. & Traore, A. S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African journal of biotechnology*, **4**, 823-828.
- Klaus, W. & Ehrendorfer, F. (1989). Mediterranean pines and their history. In: Woody plants—evolution and distribution since the Tertiary. Pp. 133-163. Springer.
- Kranl, K., Schlesier, K., Bitsch, R., Hermann, H., Rohe, M. & Böhm, V. (2005). Comparing antioxidative food additives and secondary plant products—use of different assays. *Food Chemistry*, **93**, 171-175.
- Lepock, J. R., Frey, H. E., Bayne, H. & 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.
- Letreuch-Belarouci, N. (1991). Les reboisements en Algérie et leurs perspectives d'avenir. *Vol. OPU, Alger*, **294**.
- Li, H., Pordesimo, L. & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, **37**, 731-738.
- Lippi, G., Avanzini, P., Pavesi, F., Bardi, M., Ippolito, L., Aloe, R. & Favaloro, E. J. (2011). Studies on in vitro hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens. *Biochemia medica*, **21**, 297-305.
- Manaargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pougna, J.-L. & Perrin, C. (2016). Hemolysis by surfactants—A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, **228**, 1-16.
- Mendonca, R., Silveira, A. A. & Conran, N. (2016). Red cell DAMPs and inflammation. *Inflammation Research*, **65**, 665-678.
- Messai, N., Berchi, S., Boulknaf, F. & Louadi, K. (2010). Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Entomologie faunistique-Faunistic entomology*.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, **26**, 211-219.
- N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D. & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, **6**.

- Nergiz, C. & İclalDönmez (2004). Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chem*, **86**, 365-368.
- Noureddine, B., Yacine, B. & Fadila, M.-B. (2013). Evaluation of erythrocytes toxicity and antioxidant activity of alkaloids of *Fumaria capreolata*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **4**, P770-P776.
- Orban, J. C., Ichai, C. & Quintard, H. (2011). Désordres métaboliques et réanimation
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, **44**, 307-315.
- Portier, K., Kirschvink, N., Fellmann, N., Coudert, J. & Lekeux, P. (2007). Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. In: *Annales de Médecine Vétérinaire*. Pp. 101-106. ULg-Université de Liège.
- Post, G. E. (1932). Flora of Syria, Palestine, and Sinai. Рипол Классик.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, **26**, 1231-1237.
- Rolland, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, **11**, 419-424.
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T. & Fernie, A. R. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, **72**, 21-34.
- Sakat, S., Juvekar, A. R. & Gambhire, M. N. (2010). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci*, **2**, 146-155.
- Sbay, H. (2000). Nouveau test de provenance de *Pinus pinea* au Maroc. In: *Actas (II) del Primer. Simposio del pino del Pinonero*. Pp. 22-24.
- Shakeri, A., Hazeri, N., Vlizadeh, J., Ghasemi, A. & Tavallaei, F. Z. (2012). Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant activities of *Anabasis aphylla* L. extracts. *Kragujevac Journal of Science*, **34**, 71-78.
- Shobana, S. & Vidhya, R. (2016). Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon indicum* (Linn.). *World J Pharm Pharm Sci*, **5**, 1182-96.
- Shotipruk, A., Kaufman, P. B. & Wang, H. Y. (2001). Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *menthaxpiperata* using ultrasonic extraction. *Biotechnology progress*, **17**, 924-928.

- Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Nájera, F., López-Romero, J. M. & Cuevas, A. (2004). Phytochemical variations within populations of *Platycapnos saxicola* Willk. *Biochemical systematics and ecology*, **32**, 565-572.
- THABEET, A., DENELLE, N., EL KHORCHANI, A., THOMAS, A. & GADBIN-HENRY, C. (2007). Etude dendroclimatologique de quatre populations de pin pignon en Tunisie. *Forêt méditerranéenne*, **28**, 219-228.
- Virjamo, V. & Julkunen-Tiitto, R. (2018). Quality and quantity of piperidine alkaloids in needles and bark of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings. *Phytochemistry Letters*, **26**, 106-109.
- Wang, L. & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 300-312.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J. & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105**, 940-949.
- Wollinger, A., Perrin, E., Chahboun, J. & Jeannot, V. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*, **xxx**, 1-12.
- ZANNDUCHE.O., 2001-Etude Comparative de la croissance de trois espèces forestières : *Pinus pinea* L. *Pinus pinaster* Ait et *Pinus canariensis* Ch. Switch. Aspect Eco. Dendrométrie. Thèse de magistère. Université. Mouloud Mammeri. Tizi. Ouzou.100p

Annexes

Annexe N°1

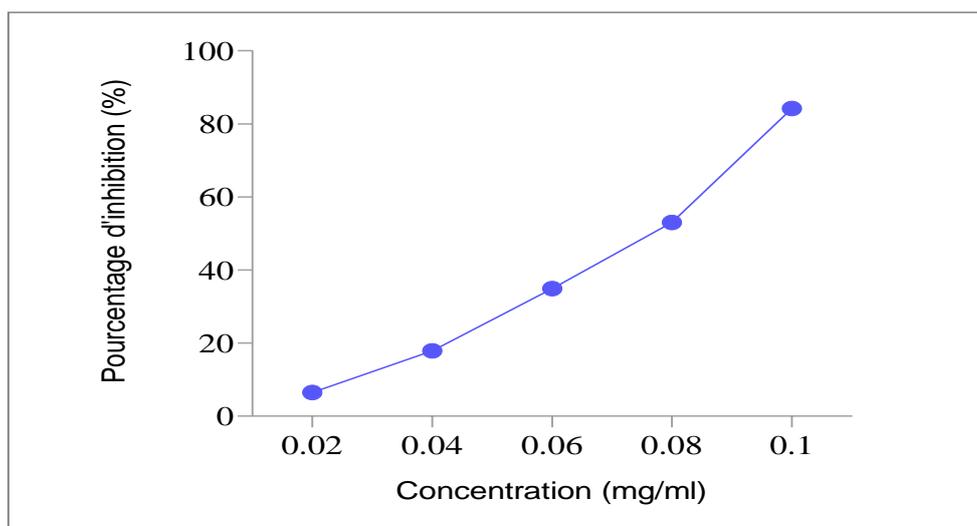


Figure1 : Pourcentage d'inhibition de radical $ABTS^+$ à différentes concentrations d'acide ascorbique

Annexe N°2

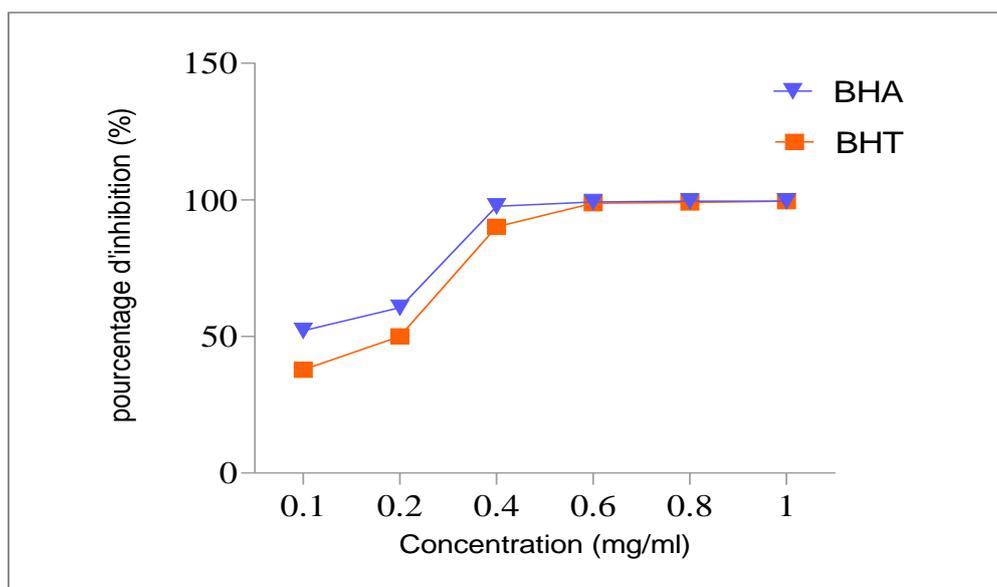


Figure2 : Pourcentage d'inhibition de radical $ABTS^+$ à différentes concentrations de BHA et BHT

Annexe N°3

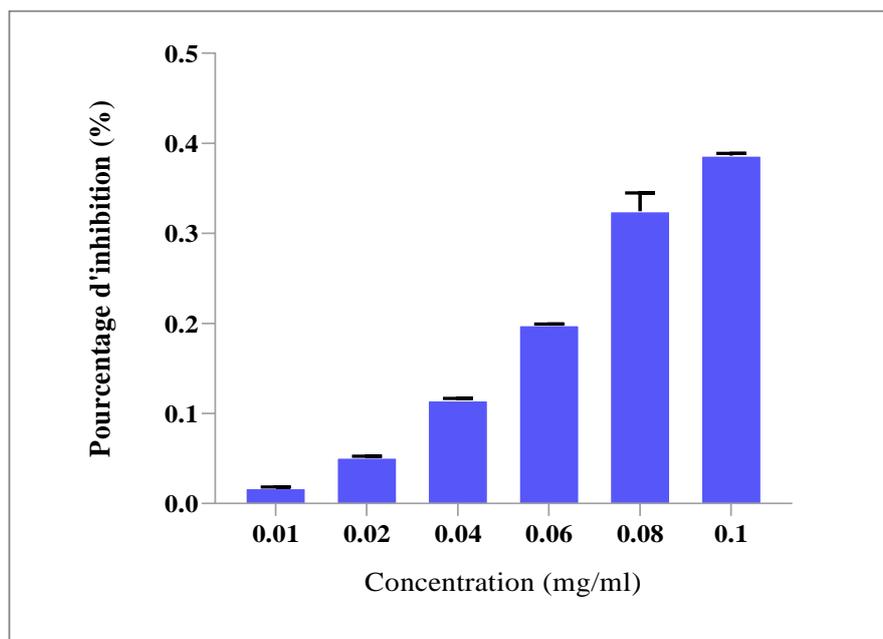


Figure 3 : Le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

Annexe N°4

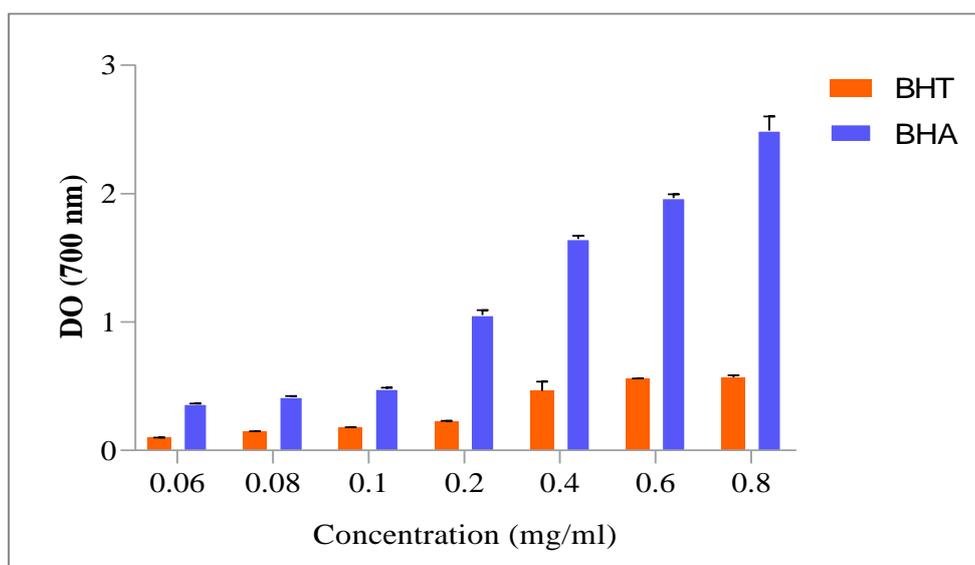


Figure 4 : Le pouvoir réducteur de BHA et BHT.

Annexe N°5

Préparation des solutions pour les tests de l'activité antioxydant

➤ Préparation de tampon phosphate à pH = 6,6

Une masse de 1.076 g de Na_2HPO_4 et 0.826 g de NH_2PO_4 sont dissous dans un volume de dH_2O , le pH est ajusté à 6,6 et le volume de la solution est complété à 100ml.

➤ Préparation de ferricyanure de potassium à 1%

Une masse de 1 g de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) est dissous dans 100 ml de dH_2O .

➤ **Préparation de l'acide trichloracétique à 10 %**

10 g d'acide trichloracétique (TCA) sont dissous dans 100ml de dH_2O .

➤ **Préparation de solution PBS**

La solution de PBS est Préparée en mélangeant progressivement 1,44 g de Na_2HPO_4 avec 0,245 g de KH_2PO_4 et 8 g de NaCl et 0,2 g de KCl dans un volume de dH_2O , le pH est ajusté à 7.4 et le volume de la solution est complété à 100mL.

➤ **Solutions PBS à différentes concentrations de NaCl :**

0.9 % de NaCl : 0,9 % g de NaCl dans 100 ml de PBS à pH 7,4.

0.7 % de NaCl : 0,7 % g de NaCl dans 100 ml de PBS à pH 7,4.

0.5 % de NaCl : 0,5 % g de NaCl dans 100 ml de PBS à pH 7,4.

Résumé

Le pin est l'une des plantes médicinales traditionnelles qui possède de nombreuses propriétés biologiques, attribuées à sa richesse en principes actifs. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'extrait alcaloïdique de la coque des graines de *Pinus pinea* L. et à son pouvoir antioxydant et anti-hémolytique. L'étude du pouvoir antioxydant a été réalisée par deux méthodes différentes, le test du pouvoir réducteur et le test de piégeage du radical ABTS. Les résultats obtenus montrent qu'à une concentration de 10mg/ml d'extrait, le taux d'inhibition du radical ABTS est de $91,347 \pm 0,093$ % avec une IC50 de 3,368 mg/ml et un pouvoir réducteur d'une absorbance de $0,743 \pm 0,0014$. En revanche, la deuxième partie a consisté à étudier le pouvoir anti-hémolytique par deux méthodes, l'effet protecteur de l'extrait contre l'hémolyse induite par la chaleur et l'hémolyse osmotique induite par des solutions de NaCl à différentes concentrations. Les résultats ont montré que l'extrait alcaloïdique, à une concentration de 1 mg/ml, avait un pourcentage de protection de $60 \pm 0,692$ % contre l'hémolyse osmotique, tandis qu'à une concentration de 0,8 mg/ml, a montré un pourcentage de protection de $68,124 \pm 1,198$ %.

Mot clés : *Pinus pinea* L., Alcaloïde, Activité antioxydant, Activité anti-hémolytique.

Abstract

Pine is one of the traditional medicinal plants that has many biological properties, attributed to its richness in active principles. In the present study, we were interested in the alkaloid extract of the seed shell of *Pinus pinea* L. and its antioxidant and anti-hemolytic activity. The study of the antioxidant activity was performed by two different methods, the reducing power test and the ABTS radical scavenging test. The results obtained show that at a concentration of 10mg/ml of extract, the inhibition rate of ABTS radical is 91.347 ± 0.093 % with an IC50 of 3.368 mg/ml and a reducing power of an absorbance of 0.743 ± 0.0014 . On the other hand, the second part consisted in studying the anti-hemolytic power by two methods, the protective effect of the extract against heat-induced hemolysis and osmotic hemolysis induced by NaCl solutions at different concentrations. The results showed that the alkaloid extract, at a concentration of 1 mg/ml, had a percentage protection of 60 ± 0.692 % against osmotic hemolysis, while at a concentration of 0.8 mg/ml, showed a percentage protection of 68.124 ± 1.198 %.

Keywords: *Pinus pinea* L., Alkaloid, Antioxidant activity, Antihemolytic activity.

ملخص

يعتبر الصنوبر من النباتات الطبية التقليدية التي لها العديد من الخصائص البيولوجية ، ويعزى ذلك إلى ثرائها في المكونات النشطة. في هذه الدراسة ، نحن مهتمون بالمستخلص القلوي لقشرة بذور *Pinus pinea* L. وقوته المضادة للأوكسدة والمضادة للانحلال. تم إجراء دراسة القوة المضادة للأوكسدة بطريقتين مختلفتين، اختبار القدرة المختزلة واختبار الكسح الجذري ABTS. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنه عند تركيز 10 مجم / مل من المستخلص ، فإن معدل تثبيط جذر ABTS هو 91.347 ± 0.093 % مع IC50 من 3.368 مجم / مل وقوة مخفضة للامتصاص 0.743 ± 0.0014 . من ناحية أخرى ، يتكون الجزء الثاني من دراسة القدرة المضادة للانحلال بطريقتين ، التأثير الوقائي للمستخلص ضد انحلال الدم الناجم عن الحرارة وانحلال الدم التناضحي الناجم عن محاليل كلوريد الصوديوم بتركيزات مختلفة. أظهرت النتائج أن المستخلص القلوي بتركيز 1 مجم / مل له نسبة حماية 60 ± 0.692 % ضد انحلال الدم التناضحي ، بينما بتركيز 0.8 مجم / مل أظهرت نسبة حماية 68.124 ± 1.198 %.

الكلمات المفتاحية: *Pinus pinea* L. ، قلويد ، نشاط مضاد للأوكسدة ، نشاط مضاد للانحلال.

