



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 :

CHIROUANE Roukia & MOUGARI Fethia

Thème

Contribution à l'étude de certaines activités biologiques et propriétés fonctionnelles d'un extrait polysaccharidique des graines de Pinus pinea L.

Soutenu le : 15 / 09 / 2021

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M. LEKBAL Farouk

MAA

Univ. de Bouira

Président

M. KADRI Nabil

MCA

Univ. de Bouira

Promoteur

M. BENZITOUNE Nourelimane

Doctorante

Univ de Bouira

Co-Promoteur

M. TIGHILET Karim

MAA

Univ de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2020/2021



Remerciement

*Au Nom D'Allah Le Clément Le Miséricordieux Paix Et Salam Sur Son Prophète
Mohammed*

*En tout premier lieu, nous remercions Allah, tout miséricordieux de nous avoir
illuminées le chemin vers le savoir et la science et de nous avoir donné la force et le
courage pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous adressons nos plus vifs remerciements à notre encadreur Dr **KADRI Nabil**
maître de conférences la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université
de Bouira, qui nous guidées, nous vous remercions d'avoir été suivit régulièrement
pour la réalisation de ce travail, pour sa gentillesse, ces conseils précieux et ces
encouragement.*

*Nous présentons notre plus grand respect à notre Co-encadreur Mlle **BENZITOUNE
IMANE** doctorante de Département des Sciences Biologiques de l'université de
Bouira pour ses efforts, son guide, ses conseils, sa disponibilité, ces encouragements et
sa patience au cours de ce travail.*

*Nous remercions également messieurs les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous
ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement :*

*Monsieur **LEKBAL**, maitre-assistant à l'université de Bouira, pour accepter de
présidé ce jury.*

*Monsieur **TIGHILT**, maitre-assistant à l'université de Bouira, pour accepter
d'examiner ce travail*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué
directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

(Roukia et Fthia)

Dédicaces

*Avec l'aide d'ALLAH le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je
dédie*

A mon père Mohamed

*Ta sagesse et ton courage ont toujours été sécurisants pour moi. Tu es aussi un
travailleur exemplaire et infatigable, tu as toujours subvenu à nos besoins, tu as
rempli pleinement ton rôle de père. Je souhaite que Dieu te préserve en bonne santé*

A ma mère Fatima

*Qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et
soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité. J'espère que je suis à la
hauteur de tes attentes. Que Dieu te bénisse et te donne longue vie .*

A mes chères sœurs

Naima, Karima et Chahira

A mon cher frère et sa femme

Said et Khadija

A toute ma grande famille

A mon binôme Roukja

A tous mes amis

Fethia

Dédicace

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :

*À ma mère **Leloucha**; tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, et puisse Dieu le tout puissant te préserver, t'accorder la santé, longue vie et bonheur. Je t'aime Maman.*

*À mon père **Saad**; Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous que Dieu fasse que je continue à bénéficier longtemps encore de tes conseils. Je t'aime papa.*

Merci pour tout

À mes frères : Fathi, Omar, Samir, Abdelhak, Abderrahmane

À ma sœur : Amira

À mes belles sœurs : Nadia et Sara

À mes neveux Abdallah Et Ismail, ma nièce Aya

À mes cousines et mes amis

À mon binôme Fethia

À ma promotion biochimie appliquée 2021 université de Bouira

Roukia

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS: 2, 2'azinobis-(3-6 ethyle-benzothiazoline-6-sulfonate)

AX : arabinoxylanes

BHA : Butyle Hydrox Anisole

BHT: Butylated hydroxytoluene

°C : Degré Celsius

DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

DO : Densité Optique

EC : capacité émulsifiante

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

Fuc: Fucose

FRAP : Pouvoir antioxydant réducteur du fer

FS : stabilité de la mousse

g: gramme

Gal : Galactose

Glc : Glucose

h : heure

ha : hectare

HCl : acide chlorhydrique

HDL : High density lipoprotein

H⁺ : Proton

IC50 : Concentration inhibitrice de 50%

IRTF : Infrarouge à transformée de fourrier

LDL : Low density lipoprotein

M : Molaire

mg : Milligramme

min : minute

ORAC :Oxygen Radical Absorbance Capacity

PBS : Phosphate Salin Buffer

PI : Pourcentage d'inhibition

ROO : Peroxyde

rpm : rotation par minute

s : seconde

TCA : Acide trichloroacétique

TRAP :Total Radical trapping Antioxidant Parameter

Glc : Glucose

XG : Xyloglucanes

Xyl : xylose

% : Pourcentage

µg /ml : Microgramme par millilitre

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Ecorce de pin pignon	3
Figure 2 : Bourgeons de pin pignon	4
Figure 3: Aiguilles de pin pignon	4
Figure 4: Cône avec graines de pin pignon.....	4
Figure 5 : Pignons	4
Figure 6: La distribution du pin pignon dans le bassin méditerranéen	6
Figure 7: La distribution du pin pignon en Algérie	8
Figure 8: Répartition géographique des plantations du pin pignon en Algérie	8
Figure 9 : La structure des arabinoxylanes	13
Figure 10: Structure des xyloglucanes	14
Figure 11: Photographies originales des graines sèches de <i>P. pinea</i> L. (a) et montage de soxhlet utilisé pour la délipidation (b).....	20
Figure 12 : Protocole expérimental de l'extraction des polysaccharides des pignons de pin	21
Figure 13: Formation et piégeage du radical ABTS ⁺ par un antioxydant donneur de H [•]	25
Figure 14: Photo originale de la suspension érythrocytaire préparée	27
Figure 15 : photo originale des échantillons à différentes concentrations.....	28
Figure 16 : Composition des fractions polysaccharidiques en sucres totaux et protéines.	31
Figure 17 : Spectres IRTF des extraits polysaccharidiques déprotéinisé et non déprotéinisé des graines de <i>Pinus pinea</i> L.....	32
Figure 18 : Photo représentante de la mousse formée par les polysaccharides et la stabilité de cette mousse après 30 min.	35
Figure 19 : Photo représentante de la capacité émulsifiante des polysaccharides et la stabilité de l'émulsion après 30 min.	36
Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de radical ABTS à différentes concentrations de l'extrait polysaccharidique.....	36
Figure 21 : Pourcentage d'inhibition de radical ABTS à différentes concentrations de l'acide ascorbique (a) et du BHA et BHT (b).	37
Figure 22 : Variation des DO du pouvoir réducteur de fer de l'extrait polysaccharidique.	39
Figure 23 : Variation des DO du pouvoir réducteur de fer de l'acide ascorbique.....	40
Figure 24: Variation des DO du pouvoir réducteur de fer du BHA et BHT.....	40
Figure 25 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations de l'extrait polysaccharidique.	42

Figure 26 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations d'acide salicylique.....	42
Figure 27 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis de du stress thermique en fonction des différentes concentrations d'acide salicylique et d'extrait polysaccharidique.....	44

LISTE DES TABLEAUX

Table I: Teneur des graines de pin pignon en lipides, en acide gras, en flavonoïdes, en protéines, et en polyphénols totaux	9
Table II: Le rendement d'extraction des polysaccharides.....	30
Table III: Solubilité, la capacité de rétention d'eau et la capacité de rétention d'huile de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé	34
Table IV: Propriétés émulsifiantes et moussantes de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé.....	35
Table V: La concentration inhibitrice (IC50) de l'extrait polysaccharidique et des antioxydants standards.....	37

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Partie I :Synthèse bibliographique

I.Généralités sur le pin pignon 3

I.2. Présentation de l'espèce *Pinus pinea* L. 5

I.2.1.Taxonomie 5

I.2.2. Distribution géographique 5

I.2.3. La composition chimique 9

I.2.4. Usage et propriétés biologiques de pin pignon..... 9

I.2.4.1.Utilisation traditionnelle et activités biologiques 10

II.Généralités sur les polysaccharides 10

II.1. Les polysaccharides des végétaux 11

II.1.1. Les polysaccharides structuraux..... 11

II.1.2.Les polysaccharides de réserves..... 11

II.1.3. Les exsudats et gommes ou mucilages 11

II.2. La biosynthèse et la structure des polysaccharides des graines oléagineuses 12

II.2.1. Le mucilage 12

II.2.2. Les arabinoxylanes 12

II.2.3. Les xyloglucanes 13

II.3. Les propriétés fonctionnelles des polysaccharides 14

II.3.1. Exsudats et mucilages 15

II.3.2. Les galactomannanes..... 15

II.4. Les propriétés biologiques des polysaccharides extraits des plantes 15

II.4.1. Activité Antioxydante	16
II.4.2. Activité anti-inflammatoire	16
II.4.3. Activité immunomodulatrice.....	16
II.4.4. Activité antiviral.....	17
II.4.5. Activité prébiotique.....	17

Partie II :Matériels et Méthodes

I.Matériel.....	19
I.1. Matériel végétal	19
I.2. Sang	19
I.3. Réactifs et produits chimiques.....	19
II. Méthodes	19
II.1. Préparation de la poudre végétale et délipidation	19
II.2. Préparation de l'extrait polysaccharidique.....	20
II.3. Rendement d'extraction	21
II.4. Dosage de sucres et des protéines totaux	21
II.4.1 Dosage de sucres totaux	21
II.4.1 Dosage de protéines totaux.....	22
II.5. Analyse des extraits polysaccharidiques par IRTF	23
II.6. Evaluation des propriétés fonctionnelles.....	23
II.6.1. Solubilité	23
II.6.2. Capacité de rétention d'eau/huile.....	23
II.6.3. Propriétés émulsifiantes	24
II.6.3. Propriétés moussantes	24
II.7. Evaluation des activités biologiques	25
II.7.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	25
II.7.2. Evaluation de l'activité anti-hémolytique	27

Partie III :Résultats et Discussion

I.Rendement d'extraction des polysaccharides.....	30
---	----

II.Composition chimique des fractions polysaccharidiques	31
III.Analyse IR-TF des extraits polysaccharidique déprotéinisé et non déprotéinisé	32
IV.Propriétés fonctionnelles de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé	33
IV.1. Solubilité et capacité de rétention d'eau et d'huile	33
IV.2. Propriétés émulsifiantes et moussantes.....	34
V.Activités biologiques de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé	36
V.1. Activité antioxydante	36
V.1.1.Test de piégeage du radical libre ABTS	36
V.1.2. Pouvoir réducteur de fer.....	38
V.2. Activité anti-hémolytique.....	41
V.2.1. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique	41
V.2.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique.....	43
Conclusion générale et perspectives	45
Références bibliographique	
Annexes	

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Depuis l'Antiquité, l'homme n'a pas cessé de rechercher dans la nature les différentes sources qui lui permettent de subvenir à ses besoins nutritionnels, vestimentaires et aussi médicaux (**Karou et al., 2005**). Au fil du temps, les connaissances expérimentales accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme une source essentielle de médicaments (**Boutaghane 2013**).

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. Des recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir des différentes sources telles que les cultures agricoles et horticoles ou les plantes médicinales (**Messai et al., 2010**).

Le pin pignon (*Pinus pinea* L.) est l'un des neuf principaux fruits à coque espèces dans le monde. Étant endémique du bassin méditerranéen, il a une grande importance économique. Les pignons de pin sont traditionnellement commercialisés et consommés (**Evaristo et al., 2013**). En Algérie, le pin pignon est une essence forestière présente sous forme de reboisement. Il occupe une superficie totale de 3506 ha, la plus grande surface se trouve dans le massif de Djebel Ouahch (**Touaba and Alatou 2017**). La graine de *Pinus pinea* L. sont hautement nutritifs et présentent une composition chimique intéressante (**Evaristo et al., 2013**). La plupart des travaux réalisés sur cette graine ont porté sur l'étude phytochimique et notamment sur sa fraction lipidique (**Nergiz and Dönmez 2004**). À notre connaissance, il n'y a pas d'études antérieures sur leurs polysaccharides.

Les polysaccharides présents dans la plupart des organismes vivants, se trouve dans les algues, les animaux et principalement dans les végétaux. Au cours des dernières années, les polysaccharides naturels ont suscité de plus en plus d'attention pour des activités pharmacologiques intéressantes sans entraîner d'effets secondaires significatifs. Il est rapporté que des polysaccharides isolés à partir de différentes ressources naturelles présentaient des activités anti-tumorales, analgésiques, immunomodulatrice, radioprotectrice, antidiabétique, hépatoprotectrice, antivirale, antifatigue, antioxydantes et anti-inflammatoire (**Chen et al., 2019, Wang et al., 2018, Jeddou et al., 2016**). Ces activités biologiques des polysaccharides sont étroitement liées à leurs structures chimiques (**Jeddou et al., 2016**).

Dans ce contexte, l'objectif de la présente étude s'articulera en trois grandes parties

- La première partie, est consacrée à l'étude bibliographique de la plante *P. pinea* L., sa taxonomie, sa description botanique, sa distribution géographique, sa composition biochimique, son utilisation et ses activités biologiques ainsi qu'un aperçu bibliographique sur les polysaccharides (biosynthèse, structure, propriétés fonctionnelles et activité biologique).
- La deuxième partie traitera la description du matériel et des méthodes utilisés, d'où nous nous sommes fixés plusieurs objectifs, à savoir :
 - ✚ La préparation de des extraits polysaccharidiques.
 - ✚ La quantification des sucres et protéines totaux des extraits.
 - ✚ L'analyse des extraits par spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (IRTF).
 - ✚ L'évaluation des propriétés fonctionnelles et activités biologiques de l'extrait polysaccharidique.

Enfin, dans la troisième partie, nous avons rapporté les résultats obtenus entre autre les rendements d'extractions, les teneurs en sucres et protéines totaux, les spectres IRTF des extraits et l'étude de différentes activités biologiques et propriétés fonctionnelles des extraits des graines de *Pinus pinea* L.

Partie I :
Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le pin pignon

Le Pin pignon (*Pinus pinea* L.), est un arbre qui peut atteindre 30 m de hauteur et plus de 6 m de circonférence. De croissance lente, sa longévité est d'environ 200 à 250 ans (**Touaba and Alatou 2017**). C'est une espèce dont la silhouette est très caractéristique à tous les âges. Les jeunes pins ont un port en boule qui est pratiquement unique. A l'âge adulte, la croissance en hauteur diminue, tandis que les branches maitresses continuent à s'allonger latéralement, donnant ainsi à l'arbre son aspect typique de parasol (**Loulou 1978**). Les arbres perdent les branches les plus basses par élagage naturel (**Touaba and Alatou 2017**).

La croissance est monocyclique avec les rameaux primaires d'un gris verdâtre. Le rhytidome, initialement écailleux est brun rougeâtre, devient crevassé et se divise en plaques grandes et longues, d'un gris plutôt clair avec une couleur rouge cannelle à l'intérieur (**Touaba and Alatou 2017**).



Figure 1: Ecorce de pin pignon (**Touaba and Alatou 2017**)

Les aiguilles, d'un vert glauque, réunies sur les rameaux sont généralement fasciculées par deux, longues de 10 à 20 cm et épaisses de 1,5 à 2 mm. Flexibles et dentelées, avec un apex pointu souvent jaunâtre, elles tombent la 3ème ou la 4ème année (**Touaba and Alatou 2017**). Les bourgeons sont cylindriques, pointus avec des écailles réfléchies, d'un brun clair frangées de blanc ; ils ne sont pas résineux. La période de floraison est comprise entre mai et juin (**Touaba and Alatou 2017**).

Le *pinus pinea* L. produit des fruits à maturité qui sont des cônes (pomme de pin ou pigne) solitaires (rarement réunis par 2 ou 3), arrondis, ovoïdo-conique, de 8 à 14 cm de long et de 7 à 10 cm de large d'un brun roux brillant. Ils possèdent des écailles en écusson renflé, à ombilic peu saillant, contenant des graines noirâtres, grosses à coque ligneuse sont groupées par deux à la base de chacune des écailles renfermant des amandes ailées comestibles (pignons) (**Adili 2012**).



Figure 2: Bourgeons et de pin pignon **Figure 3:** Aiguilles de pin pignon

(Touaba and Alatou 2017)(Touaba and Alatou 2017)



Figure 4:cône avec graines de pin pignon **Figure 5 :** pignons(Adili 2012).

Le système racinaire du pin pignon, poussant sur des sols sableux, comprend initialement une racine pivotante avec peu de racines latérales ; ces dernières colonisent les couches superficielles du sol avec un développement horizontal, et se subdivisent de manière plus ou moins dichotomique donnant finalement naissance à un système d'exploration du sol, complexe et multistratifié(Adili 2012).

Le pin pignon suscite un intérêt croissant, non seulement en raison de sa rusticité, de sa différence par rapport à la nature chimique du sol, de son système racinaire très développé, de son bois de qualité, mais surtout en raison de sa fructification qui fait l'objet de transactions commerciales annuelles dont la valeur dépasse parfois largement celle de la production de bois (Touaba and Alatou 2017).

I.2. Présentation de l'espèce *Pinus pinea* L.

I.2.1. Taxonomie

Le nom latin de l'espèce est *Pinus pinea* L. connu aussi sous le nom de *Pinus sativa*, le nom commun le plus utilisé est le pin pignon mais d'autres appellations sont utilisées comme pin parasol, pin franc, pin bon, pin d'Italie, pin de pierre (Lim 2012). Le nom « pin méditerranéen » a aussi été proposé du fait de la large répartition géographique de cette espèce sur le pourtour du bassin méditerranéen (Nakhoul 2020).

Cette espèce appartient à la famille des Pinaceae (sous famille des Pinoïdæ). Les botanistes ont établi, sur des bases différentes, plusieurs divisions du genre *Pinus*. Il est divisé en trois sous genres; *Strobus*, *Ducampopinus* et *Pinus* (Price 1989). Le sous-genre *Pinus* est à son tour divisé en 6 sections dont la section *Pinea* comprenant uniquement l'espèce *Pinus pinea* L. La position taxonomique du pin pignon est la suivante (Gaussen 1982, Ozenda 1991) :

- Embranchement : *Spermaphytes*
- Sous Embranchement : *Gymnospermes*
- Classe : *Coniféroopsidae*
- Ordre : *Coniferales*
- Famille : *Pinaceae*
- Genre : *Pinus*
- Espèce : *pinea*

Le nom arabe : الثمرية الصنوبر

Le nom kabyle :

P. pinea L. est une espèce isolée des autres espèces méditerranéennes et difficile à classer en raison de son incompatibilité au croisement avec tous les autres pins (Mirov 1967).

I.2.2. Distribution géographique

❖ La distribution géographique dans le monde

La superficie totale couverte par le Pin pignon dans le monde est estimée à 600 000 ha. L'aire de diffusion de *P. pinea* L. comprend la région méditerranéenne septentrionale, de la péninsule Ibérique à l'Anatolie jusqu'aux côtes méridionales de la mer Noire, où, dans certains secteurs, l'espèce est probablement indigène (Touaba and Alatou 2017).

❖ La distribution autour du bassin méditerranéen

La distribution du pin pignon dans la région Méditerranéenne a été extrêmement affectée par de nombreux changements dans les pratiques d'utilisation du sol et par de nombreux échanges, en

raison de l'intérêt économique de l'espèce durant différentes périodes de l'histoire. Par exemple, en Italie, les moines chrétiens ont introduit le pin pignon sur la côte adriatique.

Le pin pignon est trouvé principalement dans la région nord et orientale du bassin méditerranéen, du Portugal à la mer noire et à la côte de l'Asie de l'Ouest. Il occupe une superficie totale dans le monde estimée à plus que 700 000 ha avec une distribution centrée dans le Bassin Méditerranéen(Nakhoul 2020).

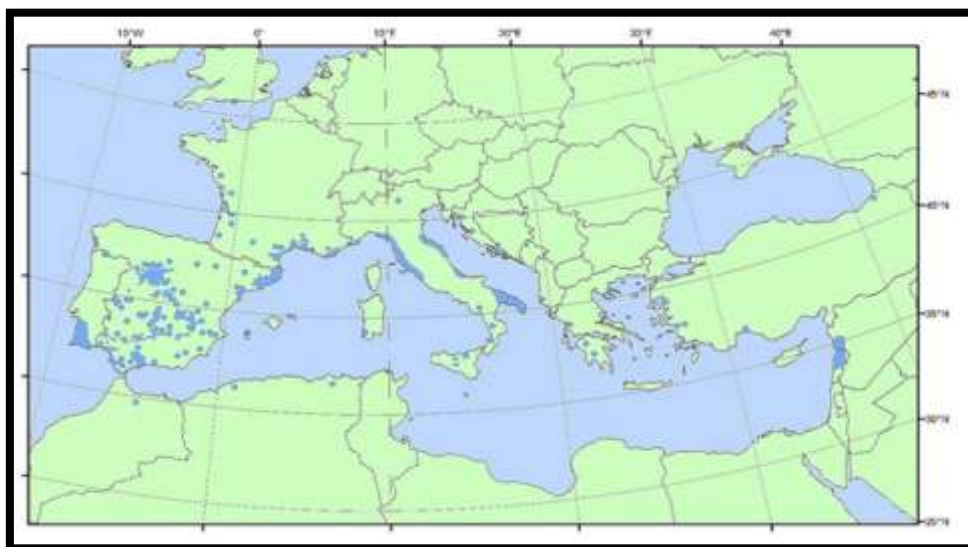


Figure 6: la distribution du pin pignon dans le bassin méditerranéen (Adili and Balandier 2013).

En Turquie, les peuplements naturels couvrent de vastes zones près de la mer de Marmara, de la mer Egée, en Turquie méridionale et sud oriental. (Anatolie, régions de Kozak et de Smyrne).(Akkemik 2000, Agrimi 1993).

En Grèce,*Pinus pinea* pousse dans les régions suivantes : îles de Crète, les îles Egéennes, les îles Ioniques et la région de Marathon (Agrimi 1993).

En Italie, l'espèce est répandue surtout le long des côtes, surtout le long du littoral de la Toscane et du Latium(Nakhoul 2020).

En France, Le Pin pignon constitue des petits peuplements plus ou moins réguliers. Ils sont rarement spontanés. En général, il s'agit de peuplements d'origine subspontanée ou artificielle. Les peuplements sont presque purs ou mixtes avec le pin maritime. On le trouve jusqu'à une altitude de 400-600m (Nakhoul 2020).

En Espagne, il occupe la plus grande superficie avec un peu plus de 442.000 ha, dont à peu près 200.000 ha d'origine naturelle. Le Pin pignon, qui se trouve ici dans son aire optimale, ne

dépasse pas 1000 m d'altitude. En Andalousie, il pousse au niveau de la mer ; dans les régions centrales il s'approche de sa limite écologique en se mélangeant au pin maritime, tandis qu'en basse altitude, il se mélange au pin d'Alep (**Nakhoul 2020**).

Au Liban, Les peuplements de pin pignon sont bien répandus au Liban mais sont particulièrement abondants sur l'ouest du Mont-Liban. Ils se distribuent de la zone côtière jusqu'à 1650 mètres d'altitude. Les études menées sur la surface totale couverte par le pin pignon au Liban ont montré des résultats un peu contrastés (**Nakhoul 2020**).

Au Portugal, Il couvre 3% de la superficie forestière totale (83 900 ha) mais la superficie avait augmenté de 10 % au cours des dernières 10 ans. Bien que se produisant dans tout le pays, la majeure partie de la zone est située dans le sud où le climat et le sol permettent un rendement plus élevé des cônes commerciaux. Les 17 stands utilisés pour la sélection des arbres pour l'échantillonnage destructif sont situés au centre et le sud du Portugal couvrant la plupart des *P. pinea* diffusion au Portugal (**Correia et al., 2010**).

❖ La distribution en Afrique

Le pin pignon n'existe pas à l'état spontané dans tout le nord de l'Afrique ; toutefois cette absence ne s'explique pas facilement, étant donné sa diffusion dans la Méditerranée occidentale de toutes les autres espèces euro-ibériques. L'introduction du pin pignon en Afrique du Nord est relativement récente même si certains auteurs n'excluent pas l'hypothèse de sa présence dans le passé à l'état spontané (**Lehou 2008**).

En Tunisie, le pin pignon occupe actuellement 20000 ha environ sur les dunes littorales, dans les subéraies dégradées et dans le maquis. Il a été utilisé pour la première fois en 1904 sur les dunes du Rimel (Bizerte) et dès 1930 à Dar chichou (Cap Bon) et Tabarka (**Touaba and Alatou 2017**). Vu sa très grande plasticité vis-à-vis du sol, il est utilisé comme essence principale dans les reboisements de fixation des dunes littorales du Nord-Ouest, Nord et Est de la Tunisie (Tabarka ; Saouania ; Nefza ; Sidi Mechreg ; Kef Abbed Sejenane ; Bechateur ; Oued Damous ; la Corniche ; Rimel ; El Azib ; Ras Djebel, Raf Raf, Ghar El Melh, Cap Bon) et dans des reboisements de production (**Adili 2012**).

Au Maroc, entre 1955 et 1992, des plantations de pin pignon ont été réalisées principalement au nord du pays et le long des régions côtières. Les reboisements les plus importants sont surtout localisés dans la région de Tanger, Larache et Tétouan. La superficie totale des reboisements est de l'ordre de 9000 ha (**Jaouadi et al., 2021**).

❖ Répartition en Algérie

Les plantations de Pin pignon ont été réalisées entre 1935 et 1974, couvrant une superficie totale de 3506 ha à Meurdja, à Baïnem et à Meslong. Les reboisements récents sont surtout localisés sur les dunes de Bon Achira, dans l'Est et le Nord-Est de Mostaganem, près de Sidi Lakhdhar, où le Pin pignon est mêlé au Pin d'Alep et à quelques Eucalyptus(Jaouadi *et al.*, 2021). Les wilayas concernées sont Constantine, Bouira, Mostaganem, Médéa et Annaba(Adili and Balandier 2013).

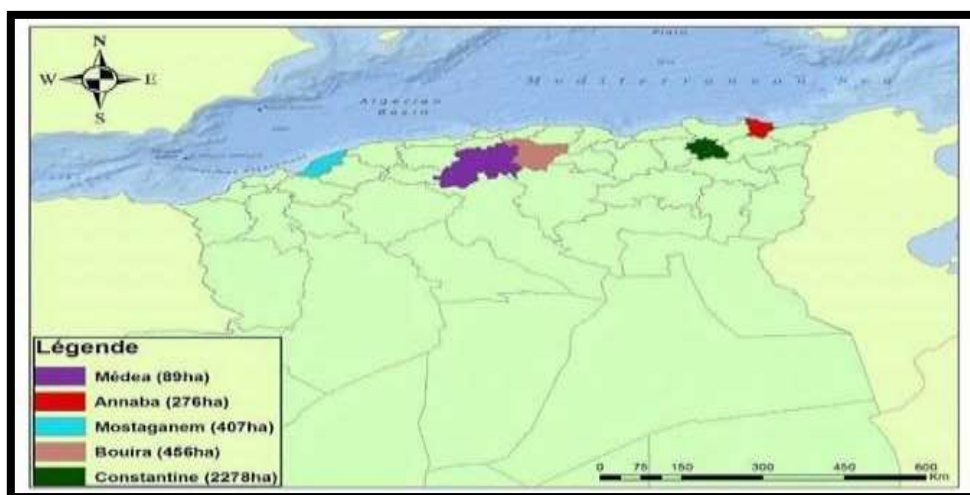


Figure 7: la distribution du pin pignon en Algérie(Adili and Balandier 2013).

D'après les résultats de l'inventaire forestier national (IFN) réalisé en 2008, les trois quarts des plantations de pin pignon concerne la wilaya de Constantine. Elles sont localisées au niveau de la région de Djebel El Ouahch.(Touaba and Alatou 2017).

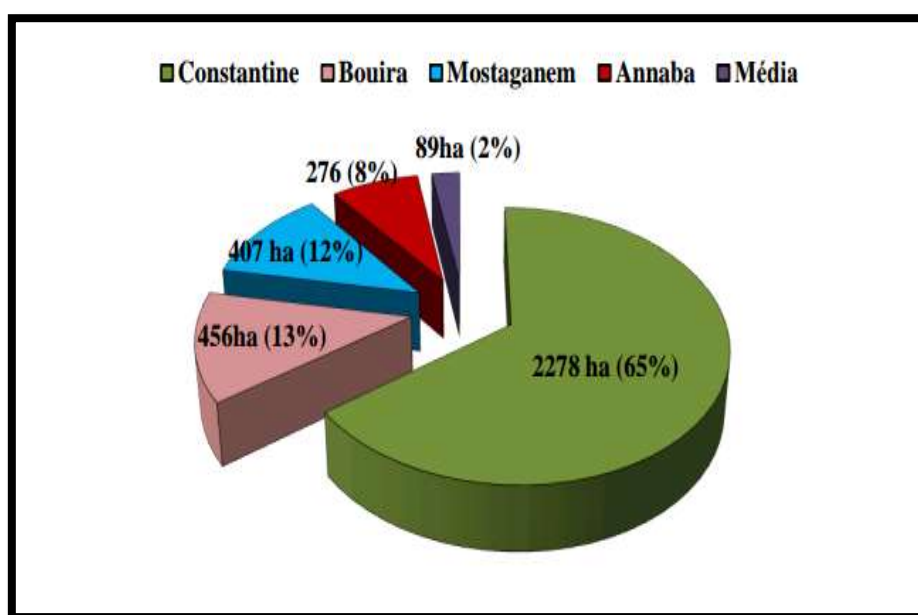


Figure 8: Répartition géographique des plantations du pin pignon en Algérie (Touaba and Alatou 2017).

I.2.3. La composition chimique

En raison de leur large éventail d'utilisations médicinales, les graines de pin ont fait d'objet de plusieurs études phyto-chimiques dans le but d'identifier ses principes actifs.

Les résultats obtenus montrent que les graines de *P. pinea* L. récoltées sur des arbres cultivés dans macrozones géographiques, différentes par leurs conditions climatiques et de croissance, présentent de bonnes propriétés nutritionnelles et saines. Tous les pignons de pin récoltés constituent une source adéquate de nutriments et de bioactifs qui justifient clairement leur inclusion dans le cadre d'une alimentation saine, dans laquelle ils contribuent à renforcer les effets bénéfiques sur la santé (Tableau I) (Lutz *et al.*, 2017).

Table I: Teneur des graines de pin pignon en lipides, en acide gras, en flavonoïdes, en protéines, et en phénols totaux (Nergiz and Dönmez 2004).

Teneur des lipides en (%)	Teneur en acide gras (g/100g)			Teneur en flavonoïdes (mg/g)	Teneur en protéines (%)	Teneur en polyphénols totaux (mg/g)
	Acide oléique	Acide linoléique	Acide palmitique			
44.9	38.6	47.6	6.49	1.42	31.6	7.99

I.2.4. Usage et propriétés biologiques de pin pignon

Le pin pignon fournit un bois de qualité qui est très résineux et résistant à l'humidité. Il est principalement employé pour les pilotis, le bois de mine, la charpente, le sciage pour menuiserie grossière et emballages, la laine de bois, la trituration pour les panneaux, la pâte à papier ou la cellulose, ainsi que dans les constructions navales (Sbay and Abourouh 2006).

En plus de la production du bois, les pinèdes sont plantées le long des côtes pour constituer des brise-vents destinés à protéger, les terrains agricoles, les infrastructures routières et les agglomérations urbaines, contre les vents marins et lessables (Sbay and Abourouh 2006).

Il joue un rôle extrêmement important dans la lutte contre l'érosion dans les régions montagneuses et dans la fixation des dunes littorales grâce à son système racinaire très bien développé (Sbay and Abourouh 2006).

Le pin pignon est également utilisé pour l'amélioration des formations dégradées du maquis permettant le développement d'une nouvelle formation végétale et l'enrichissement de paysage, favorisant ainsi le développement d'activités récréatives et touristiques (Agrimi 1993).

Outre ces utilisations, le pin pignon est bien connu depuis l'antiquité pour ses amandes très appréciées en pâtisserie et en cuisine (Sbay and Abourouh 2006).

1.2.4.1. Utilisation traditionnelle et activités biologiques

Le pin pignon est une plante qui est également utilisée en médecine traditionnelle comme remède naturel pour plusieurs maladies dont un effet sur la fatigue (Kadri *et al.*, 2015). Les pignons de pin pignon 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. Elles sont bénéfiques pour les personnes atteintes de maladies cardiovasculaires. L'huile des graines de pin pignon apporte du phosphore, du fer et de la vitamine B1, très importante pour les systèmes nerveux et musculaire. C'est une huile qui est qualifiée 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 (Sbay and Abourouh 2006). Le pin pignon a un effet anti-âge, anti-inflammatoire, antinéoplasique, antibactérien, immuno-modulateur, lié à son effet sur l'activité de la cyclo-oxygénase et enfin a aussi un effet anticancéreux et aussi l'huile de graines de pin pignon a été signalée comme une source importante d'antioxydants naturels (Kadri *et al.*, 2015).

II. Généralités sur les polysaccharides

Les polysaccharides, également appelés glycanes, sont des polymères condensés de très haut poids moléculaires. Ils sont composés de longues chaînes d'unités de monosaccharides (oses). Leur hydrolyse complète, à l'aide d'acides ou d'enzymes spécifiques, libère leurs monosaccharides ou oligosaccharides qui les composent. Ils proviennent de différentes sources. Ils peuvent provenir de plantes supérieures, de champignons, d'algues et de bactéries (Srivastava and Kulshreshtha 1989). Leurs principaux rôles dans l'organisme est de stocker l'énergie (tels que l'amidon ou le glycogène) ou de fournir un support structurel (cellulose ou chitine). Enfin, certains poly- et oligosaccharides peuvent être impliqués dans des processus de communication cellulaire (reconnaissance structurale, régulation de fonctions métaboliques, et mécanismes de défense). Ils sont le plus souvent constitués d'hexoses et/ou de pentoses liés les uns aux autres par des liaisons O-glycosidiques (Chouana 2017).

On distingue les homopolysaccharides constitués d'un seul type d'oses et des hétéropolysaccharides constitués de plusieurs oses. Ces polymères peuvent être linéaires mais également ramifiés. Lorsque plusieurs monosaccharides sont présents au sein de ces structures, c'est l'ose majoritaire suivi du suffixe « ane » qui donne son nom au polysaccharide. Les oses plus minoritaires seront associés ensuite à ce nom (Chouana 2017).

Les polysaccharides ont été largement étudiés et utilisés pour leurs propriétés technofonctionnelles dans les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques, de l'industrie papetière, agroalimentaire, et dans l'extraction pétrolière (Liu *et al.*, 2015). Plus récemment, l'utilisation des polysaccharides en tant qu'agents bioactifs a suscité un intérêt accru pour de nouvelles applications en raison de leur biocompatibilité, de leur biodégradabilité et de leur non toxicité toutes associées à l'identification d'activités biologiques portées par ces composés (Yang and Zhang 2009). L'isolement, la purification et l'utilisation des polysaccharides dépendent de leurs caractéristiques structurales mais également des matrices biologiques où ils sont présents (Yang and Zhang 2009).

II.1. Les polysaccharides des végétaux

Les polysaccharides se trouvent principalement dans les plantes et les algues qui produisent plus de 90 % des polysaccharides totaux existant sur la terre. Sur la base de leur rôle biologique, ils peuvent être classés en trois catégories : polysaccharides structuraux, polysaccharides de réserves d'énergie et exsudats, gommages ou mucilages (Di Donato 2015).

II.1.1. Les polysaccharides structuraux

Les parois cellulaires des plantes vertes et d'autres eucaryotes photosynthétiques sont constituées de polysaccharides essentiels à la croissance, au développement et à la défense des cellules. La plupart des parois cellulaires présentent une micro-architecture composée de polysaccharides fibrillaires tels que la cellulose, un hydrogel de pectine et de lignines (polymère non glucidique) (Chouana 2017).

II.1.2. Les polysaccharides de réserves

Les plantes stockent des polysaccharides comme réserve. Les plus importantes de ces réserves sont les amidons, les fructanes, les mannanes et les galactomannanes (Chouana 2017).

II.1.3. Les exsudats et gommages ou mucilages

Les gommages et les mucilages ont certaines similitudes c'est pour ça la différence entre les deux reste aujourd'hui encore ambiguë, les premières sont plutôt collantes et proviennent de la surface des arbres alors que les seconds sont des hydrocolloïdes visqueux issus de graines ou de tissus souples (Voragen *et al.*, 1995). Le terme "gomme" est utilisé pour décrire un groupe de polysaccharides d'origine naturelle, ce sont généralement des hétéropolysaccharides partiellement anioniques qui trouvent des applications industrielles généralisées en raison de leur capacité, soit à former des gels et à stabiliser des émulsions (Jani *et al.*, 2009).

Les gommages sont des produits exsudés suite à une blessure de la plante ou en raison de conditions défavorables comme la sécheresse (formation extracellulaire) (Jani *et al.*, 2009).

Les mucilages sont généralement des produits normaux du métabolisme, formés à l'intérieur de la cellule (formation intracellulaire), sont produits sans dommage pour la plante (Jani *et al.*, 2009).

Les polysaccharides constituant ces mucilages sont souvent polaires et très hydrophiles, de très hautes masses molaires, hautement ramifiés et composés de différents monosaccharides (**Petera et al., 2015**). Un des composants majeurs des mucilages est la pectine (**Wu et al., 2009**).

Le rôle physiologique du mucilage n'est pas négligeable. Puisqu'il permet à la plante d'absorber et stocker des quantités hydriques importantes. En cas de besoin, la libération progressive de l'eau vers d'autres tissus est possible en période de sécheresse. Inversement, en présence de quantités d'eau trop importantes, le gonflement du mucilage peut entraîner l'éclatement des tissus (**Jani et al., 2009**).

II.2. La biosynthèse et la structure des polysaccharides des graines oléagineuses

II.2.1. Le mucilage

II.2.1.1. Biosynthèse

Les mucilages sont des complexes de polysaccharides formés du sucre et d'acides uroniques; les mucilages d'unités forment des masses collantes dans l'eau, sont en général de composition hétérogène (**Divekar Varsha and Mohan 2010**).

Les mucilages sont généralement des produits normaux du métabolisme, formés à l'intérieur de la cellule (formation intracellulaire) et/ou sont produits sans dommage pour la plante. Le mucilage est obtenu par une hydrolyse enzymatique (pectinase) et une précipitation au sulfate d'ammonium. Cette fraction est principalement composée d'une chaîne de β -(1,4)-D-glucane (61,1 %)(**Chouana 2017**).

II.2.1.2. Structure

Les polymères constitutifs des mucilages sont en général des xylanes ou des dérivés pectiques et renferment le plus souvent des oses neutres (xylose, arabinose, galactose, rhamnose) et des acides uroniques (acide galacturonique, acide glucuronique) (**Delattre et al., 2015**).

II.2.2. Les arabinoxylanes

II.2.2.1. Biosynthèse

Les arabinoxylanes (AX) appartiennent au groupe des polysaccharides faisant partie de la famille des xylanes. Les xylanes sont des hémicelluloses constituant les parois primaires et secondaires des monocotylédones. Les AX sont composés d'une chaîne linéaire de xyloses liés en β -(1,4) avec des substitutions d'arabinoses liées en α -(1,3) et/ou α -(1,2) et pouvant présenter des substitutions de D-galactose, de L-fucose et de résidus, pour la plupart, non terminaux, non réducteurs. Dans le mucilage séminal du lin, ces AX semblent présenter beaucoup plus de ramifications que ceux présents dans les parois des végétaux. La formation du squelette de xyloses lié en β -(1,4) s'effectue par des (1-4)- β -xylosyltransférases utilisant de l'UDP-xylose comme

substrat. Les substitutions peuvent être faites par des arabinosyltransférases- β dans les graines de lin, les ESTs codant pour les rhamnose synthases et les xylosidases ont montré des expressions spécifiques dans les téguments des graines de lin durant le stade globulaire et le stade torpille (Acket 2015).

II.2.2.2. Structure

Les AX sont constitués d'une chaîne principale d'unités D-xylopyranose (xylose) liées en β -(1 \rightarrow 4). Les substituants arabinosyl sont en position α -(O-2) ou α -(O-3) des résidus xylose (mono-substitution). Les résidus xylose peuvent également être disubstitués par deux résidus arabinose en positions α -(O-2) et α -(O-3) (Zhang 2012).

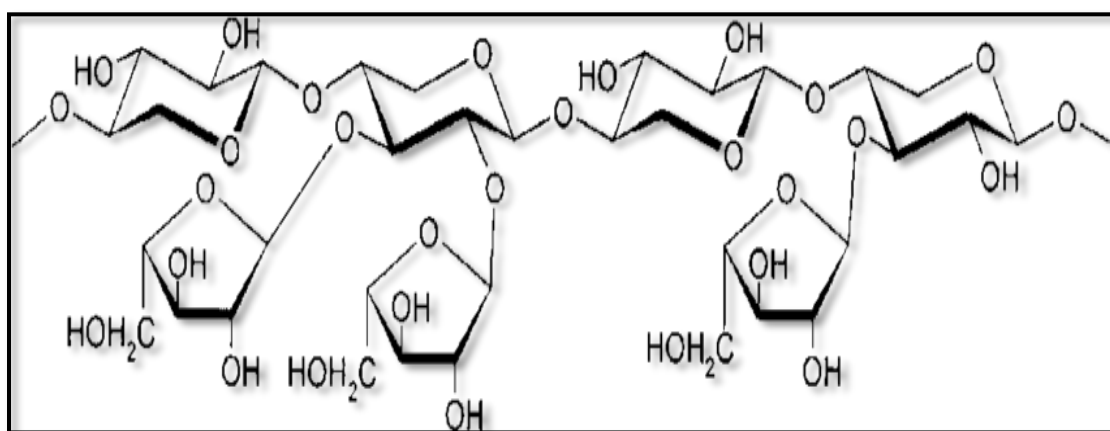


Figure 9 : La structure des arabinoxylanes (Ebringerová 2005).

II.2.3. Les xyloglucanes

II.2.3.1. Biosynthèse

Les xyloglucane (XG) sont synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi avant d'être déposés sur la paroi cellulaire. Les résidus Glc de la chaîne principale et les unités Xyl sont assemblés puis les monosaccharides additionnels viennent décorer ces structures. A la sortie de cette chaîne d'assemblage les XG sont délivrés au niveau de la membrane par exocytose des vésicules de sécrétion golgiennes pour former une matrice pariétale poreuse assemblée autour des fibres de cellulose. La synthèse nécessite l'intervention d'un certain nombre d'enzymes qui sont des protéines membranaires de type II constituées de trois domaines, un domaine N-terminal, un domaine transmembranaire et une extrémité C-terminal comportant le site catalytique de l'enzyme (Mkedder 2012).

La formation de la chaîne principale est assurée par une β -(1-4)-glucane synthase qui catalyse la formation des liaisons osidiques entre des résidus Glc, elle est supposée localisée au niveau de l'appareil de Golgi et spécifique de certaines hémicelluloses. Des résidus Xyl sont ensuite greffés aux résidus Glc par l'intermédiaire des xylosyltransférases. Ces enzymes ont la capacité de

former des branchements en α -(1,6) sur le squelette de la chaîne linéaire β -(1,4)-glucane. Les XGs β -galactosyltransférases, permettent ensuite la liaison des résidus Gal sur le Xyl et dans certain type de xyloglucane, des résidus Fuc sont reliés aux résidus Gal sous l'action des XG α -(1,2)-fucosyltransférases(Mkedder 2012).

II.2.3.2. Structure

Tous les XG sont constitués d'un squelette de β -(1,4)-D-glucane ramifié par des résidus Xyl liés en α -(1,6). Jusqu'à 75 % des résidus de la chaîne β -(1,4)-D-glucane peuvent être ramifiés. Les résidus xyl peuvent être en outre substitués par des chaînes latérales de β (1,2).(Chouana,2018). La diversité structurale de ce type d'hémicellulose est créée par la distribution du xylbranches le long de la chaîne principale(Ebringerová 2005).

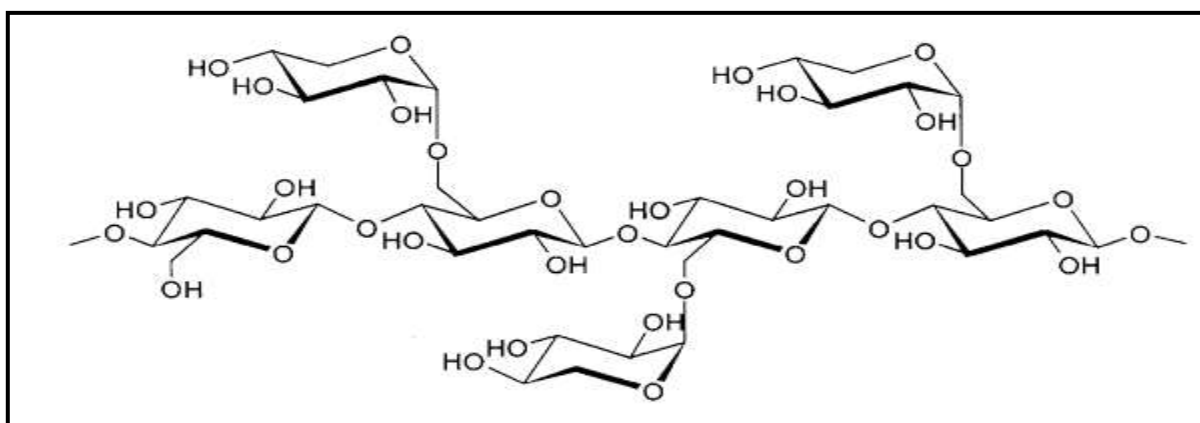


Figure 10: Structure des xyloglucanes (Ebringerová 2005).

II.3. Les propriétés fonctionnelles des polysaccharides

Les polysaccharides présentent des critères intéressants, Ce sont des polymères naturels, hydrosolubles, biodégradables et biocompatibles. Ils ont deux rôles importants : un rôle de structure et un rôle de réserve(Rasolohery 2007). Les polysaccharides sont couramment utilisés comme épaississants, stabilisants, gélifiants et agents de liaison dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétiques. Les xylanes présentent des caractéristiques physico-chimiques très différents comme leurs solubilités dans l'eau, viscosités, propriétés gélifiantes ou encore leurs propriétés d'hydratation (Benaoun 2017). Ils sont connus et utilisés dans l'alimentaire pour leurs propriétés remarquables en solution, notamment épaississantes (ex : la gomme de guar, la carboxyméthylcellulose) et gélifiantes (ex : l'alginate, la pectine, l'agar). Précisant d'une part que l'épaississement d'une solution de polysaccharide nécessite l'établissement d'enchevêtrements non-spécifiques entre les chaînes du polysaccharide qui se présentent sous formes de pelotes statistiques en solution. Ce processus dépend d'une manière générale de plusieurs paramètres tels que : la

nature du polysaccharide, la concentration d'étude, la masse molaire, la température et/ou le pH(Kouassi 2017).

II.3.1. Exsudats et mucilages

Les gommés et les mucilages ont certaines similitudes. Le terme "gomme" est utilisé pour décrire un groupe de polysaccharides d'origine naturelle qui trouvent des applications industrielles généralisées en raison de leur capacité, soit à former des gels et à stabiliser des émulsions. Cette gomme contient une fraction, de tragacanthine, constituant environ 8-10 % de la gomme, est soluble dans l'eau. L'hydrolyse de cette gomme donne de l'acide galacturonique, du D-galactopyranose, du L-arabinose, du D-rhamnose et du D-xylopyranose. Elle est également utilisée comme agent émulsifiant, de suspension et d'épaississement et de liaison (Chouana 2017).

II.3.2. Les galactomannanes

Les galactomannanes sont des épaississants purs comme les alginates. Ils forment des solutions dont la viscosité augmente avec la masse et la concentration moléculaire et diminue de façon réversible avec l'élévation de la température. Ces solutions ont un comportement pseudo-plastique : la solution paraît figée au repos mais devient souple avec agitation(Kouadri and Satha 2018).

II.4. Les propriétés biologiques des polysaccharides extraits des plantes

Les polysaccharides sont des macromolécules importantes par leurs effets thérapeutiques remarquables dans différents types de maladies traitées par les plantes, utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde(Boual *et al.*, 2015).

La diversité structurale des polysaccharides confère à ces macromolécules de nombreuses activités biologiques (Collic-Jouault *et al.*, 2004).

Des rapports récents ont révélé que les activités biologiques des polysaccharides sont étroitement liées à la conformation et la structure de leur chaîne, notamment à sa composition chimique, à son poids moléculaire et à son degré de ramification. (Fedail *et al.*, 2016).Egalement, grâce à leurs propriétés interactives et régulatrices, les polysaccharides participent au contrôle de l'activité cellulaire (prolifération, différenciation, adhésion et migration) mais aussi de l'activité de nombreuses enzymes (Collic-Jouault *et al.*, 2004).

Dans cette section, nous présentons de manière non exhaustive les principales activités biologiques des polysaccharides des végétaux, à savoir les activités antioxydantes, antivirales, anti-inflammatoires, immunomodulatrices et prébiotiques.

II.4.1. Activité Antioxydante

Les espèces réactives de l'oxygène, telles que les radicaux hydroxyles et le peroxyde d'hydrogène, sont souvent générés spontanément dans la cellule vivante au cours du métabolisme et jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire. L'oxydation induite par les radicaux libres peut entraîner une désintégration de la membrane cellulaire et une dégradation des protéines membranaires. En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et les systèmes de défenses antioxydants. On parle de stress oxydatif lorsqu'il y a un déséquilibre profond entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de pro-oxydants conduisant à des perturbations cellulaires irréversibles (CAESAR 2007).

En raison de la propriété essentielle des antioxydants (piégeage des radicaux libres), des méthodes ont été mises au point pour évaluer leur efficacité dans le piégeage des différents radicaux, tels que les peroxydes ROO par les méthodes ORAC et TRAP ; les ions ferriques par la méthode FRAP ; ou les radicaux ABTS, ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH (Tabart *et al.*, 2009).

Des études récentes ont montré que de nombreux polysaccharides naturels jouent un rôle important dans la prévention des dommages oxydatifs induits par le stress dans les organismes vivants, ils peuvent atténuer ou supprimer les effets des espèces réactives de l'oxygène (Gao *et al.*, 2015).

Chen and Huang (2019), ont signalé que l'activité biologique des polysaccharides de *Panax ginseng* se manifeste principalement sous l'aspect de l'activité antioxydante. En outre, il a été signalé que les polysaccharides de *Potentilla anserina* protègent les cellules de souris contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (Liu *et al.*, 2018).

II.4.2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est la réponse défensive vitale déclenchée par le système immunitaire contre diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse (Ndiaye *et al.*, 2006).

Cette réaction est souvent bénéfique mais il arrive parfois qu'elle endommage les cellules et les tissus (Taflin *et al.*, 2010). Le processus inflammatoire comprend l'activation des phagocytes conduisant à la libération de médiateurs chimiques tels que les prostaglandines, le facteur de nécrose tumorale et les interleukines (Abd El-Ghffar *et al.*, 2018).

Un effet anti-inflammatoire a été observé *in vivo* chez des rats *Wistar* mâles nourris avec les polysaccharides d'*Astragalus* constitué d'une chaîne de type glucane (Chouana 2017).

II.4.3. Activité immunomodulatrice

L'immunomodulation est définie comme l'action des substances qui peuvent stimuler,

supprimer ou moduler les composantes de système immunitaire inné ou adaptatif (**Chen et al., 2017**), afin de prévenir ou de traiter les maladies. Les polysaccharides immunomodulateurs sont capables de stimuler simultanément les différentes composantes du système immunitaire. Ce qui leur confère différentes propriétés thérapeutiques, notamment des propriétés anti-tumorales et anti-inflammatoires (**Sánchez 2006**). Au cours des dernières années, les activités immunomodulatrices de polysaccharides dérivés de plantes ont suscité une attention croissante (**Nie et al., 2018**).

Biophytum petersianum Klotzsch est une plante médicinale contenant deux polysaccharides (AG-I et AG II) qui présentent une activité immunomodulatrice qui stimule les leucocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces polysaccharides induisent aussi une légère activité sur les cellules T, B et les NK (**Angone et al., 2010**).

Un polysaccharide immunostimulant, qui présente une grande proportion d'arabinoxylane, a également été isolé à partir de feuilles de *Hordeum vulgare* L.. Le polysaccharide a stimulé l'activité des macrophages, ce qui montre que ce polysaccharide a un rôle dans l'expression de l'activité immunomodulatrice. Les auteurs ont souligné que l'activité immunomodulatrice est probablement liée à la complexité structurale de l'arabinoxylane (**Kim et al., 2017**).

II.4.4. Activité antiviral

Les maladies infectieuses virales mettent gravement en danger la santé humaine. Dans la recherche de médicaments antiviraux efficaces, les chercheurs ont trouvé que les polysaccharides ont une bonne activité antivirale (**Chen and Huang 2019**).

Les polysaccharides obtenus à partir d'*Azadirachta indica* agissent contre le poliovirus PV-1 en inhibant la phase initiale de la réplication virale (**Faccin-Galhardi et al., 2012**). En outre, le polysaccharide extrait des feuilles de *rhizophora apiculata* a été évalué dans des systèmes de culture cellulaire, pour son activité contre les virus de l'immunodéficience humaine et simienne (**Premanathan et al., 1999**).

II.4.5. Activité prébiotique

Le terme prébiotique désigne « un ingrédient alimentaire non digestible qui améliore la santé de l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité métabolique d'un ou d'un nombre limité de bactéries bénéfiques dans le côlon » (**Gibson and Roberfroid 1995**). donc, Le concept de prébiotiques est défini par certains critères tels que la résistance à l'acidité gastrique, à l'hydrolyse par des enzymes des tractus digestifs de mammifères et à l'absorption gastro-intestinale (**Cani et al., 2009**).

L'effet prébiotique des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *malva parviflora* L. sur *Bifidobacterium longum* est notable (**Boual et al., 2015**). De plus, l'inuline, les fructo-oligosaccharides dérivés de la racine de chicorée, les arabinoxyl-oligosaccharides dérivés du son

de blé, les xylo-oligosaccharides et les galacto-oligosaccharides, se sont avérés présenter de très bonnes propriétés prébiotiques (**Singdevsachan *et al.*, 2016**).

Partie II :
Matériels et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Dans la présente étude, la partie expérimentale a été entreprise sur des graines de *Pinus pinea* L. qui ont été achetées sur un marché local à Blida.

I.2. Sang

Les échantillons de sang utilisés pour l'étude de l'activité anti-hémolytique ont été prélevés sur des volontaires sains qui n'avaient pas pris des médicaments anti-hémolytiques récemment.

I.3. Réactifs et produits chimiques

Les produits chimiques et les réactifs utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont de grade analytique, fournis par *Sigma-aldrich*, *Prolabo* et *Biochem*.

II. Méthodes

II.1. Préparation de la poudre végétale et délipidation

Les graines de *P.pinea* L. ont été soigneusement nettoyées et séchées à l'air libre. Les pignons de pin séchés ont été finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique et conservés dans des récipients hermétiques jusqu'à la délipidation.

Pour éliminer la fraction lipidique, la poudre des pignons de pin broyée a été soumise à une délipidation à l'aide d'un extracteur soxhelt utilisant le *n*-hexane comme solvant à un rapport solvant : échantillon de 10:1 (v/m). La délipidation a été effectuée pendant 6h à 40°C. La poudre délipidée a été laissée sous la hotte afin d'aspirer complètement le solvant, puis tamisée à travers un tamis de 200µm et stockée dans des récipients hermétiques à -20°C (**Cheikh-Rouhou et al., 2006**).



Figure 11: Photographies originales des graines sèches de *P. pinea* L. (a) et montage de soxhlet utilisé pour la délipidation (b).

II.2. Préparation de l'extrait polysaccharidique

L'extraction des polysaccharides a été effectuée comme décrit par **Abbou et al. (2020)** en y apportant quelques modifications. Une masse de 5g de poudre délipidée a été mélangée avec 60 ml d'eau distillée, le mélange a été chauffé à 60°C pendant 1h avec une agitation constante à 200 rpm. Le mélange a été refroidi en immergeant le bécher dans de l'eau glacée puis centrifugé à 8000g pendant 15 min. le surnageant a été récupéré et concentré dans une étuve à 45°C jusqu'à ce que le volume soit réduit au tiers du volume initial.

➤ Précipitation des polysaccharides

Afin de précipiter les polysaccharides, trois volumes d'acétone ont été ajoutés à la solution concentrée et laissée au réfrigérateur (4°C) pendant 24h. les polysaccharides précipités ont été récupérés par centrifugation à 8000g pendant 15 min. les polysaccharides récupérés ont été bien rincés à l'eau distillée et lyophilisés.

➤ Déprotéinisation des polysaccharides

La déprotéinisation des polysaccharides a été réalisée en utilisant la méthode de **CaCl₂ (Chen et al., 2018)**. Les polysaccharides ont été remis en suspension dans de l'eau distillée (1:20 m/v) et le pH de la suspension a été ajusté à 8.0 et chauffée à 85°C. Du CaCl₂ a été ajouté à la suspension à une concentration de 5% (m/v), puis mélangé et porté à ébullition pendant 30 min. après refroidissement, le mélange a été filtré et le pH a été ajusté à 7.0 et re-précipité avec de l'acétone de la même manière que décrit ci-dessus.

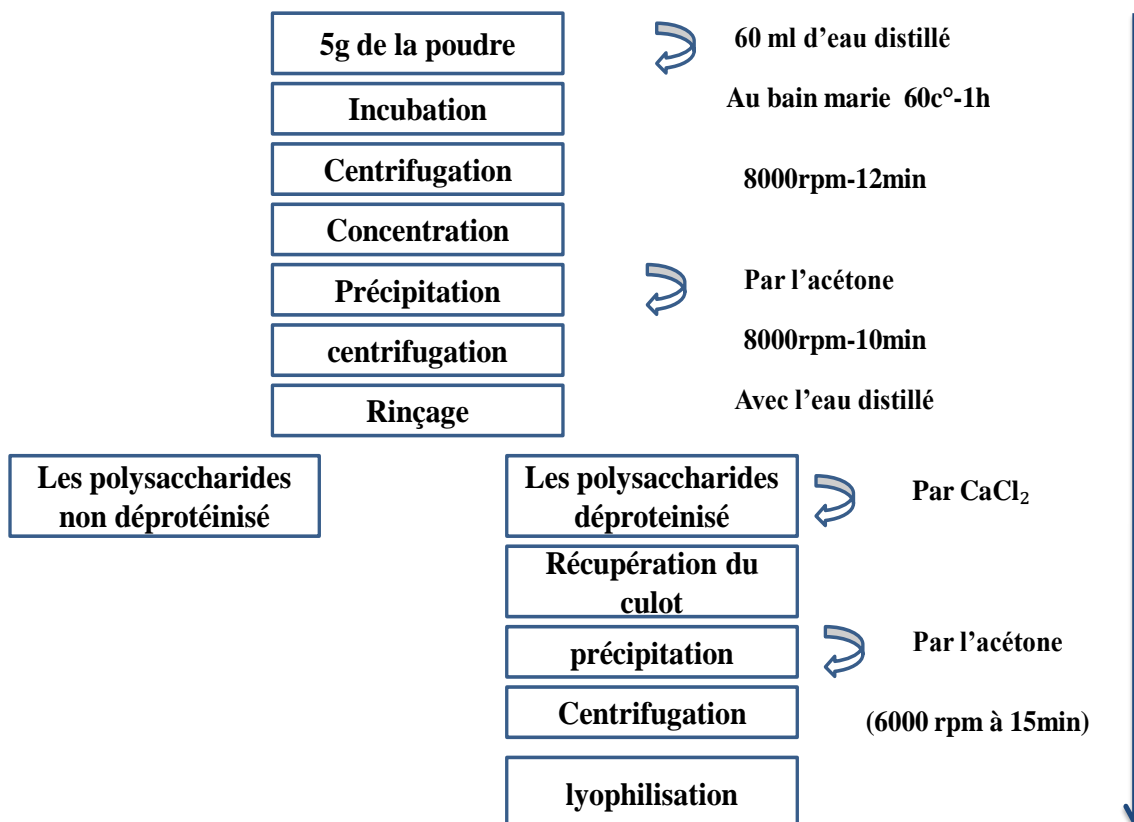


Figure 12 : Protocole expérimental de l'extraction des polysaccharides des pignons de pin (Abbou et al., 2020; Chen et al., 2018)

II.3. Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après lyophilisation, et exprimé en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la poudre soumise à l'extraction. Le rendement d'extraction des polysaccharides avant et après la déprotéinisation est calculé suivant la formule ci-dessous (Maran et al., 2013) :

$$\% \text{ Rendement d'extraction} = [(M - M_0) / m] \times 100$$

Avec :

M : Masse de l'extrait polysaccharidique avant et après la déprotéinisation.

M₀ : Masse initiale de la poudre délipidée.

II.4. Dosage de sucres et des protéines totaux

II.4.1 Dosage de sucres totaux

➤ Principe

Si les sucres sont présents sous forme de sucres libres, comme des poly- ou monosaccharides, ou liés comme des glycoprotéines ou des glycolipide, l'acide concentré dans le réactif d'Anthrone les hydrolyse d'abord en composant monosaccharides. De même, l'acide sulfurique (H_2SO_4) catalyse ensuite la déhydratation des monosaccharides pour former du furfural (à partir de pentoses) ou de l'hydroxyl furfural (à partir d'hexoses). Le furfural ou l'hydroxyl furfural formé se condense avec deux molécule de naphthol provenant du réactif Anthrone pour former un complexe bleu-vert. Ce complexe peut ensuite être quantifié en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 620 nm dans un spectrophotomètre (Morris, 1948).

➤ Mode opératoire

Le réactif d'Anthrone a été fraîchement préparé en dissolvant 0,2 g d'Anthrone dans 100 ml d'acide sulfurique concentré.

Un volume de 1000 μ l de réactif d'anthrone a été ajouté à 200 μ l des extraits polysaccharidiques déprotéinisé et non déprotéinisé (préparés avec des dilutions convenables). Les mélanges ont été vortexés et incubés à 90°C pendant 17 min. après refroidissement, les absorbances ont été mesurées à 620 nm (Yemm and Willis, 1954).

La teneur en sucres totaux des extraits polysaccharidiques a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire établie avec des concentrations précises de glucose (Annexe I).

II.4.1 Dosage de protéines totaux

➤ Principe

La méthode de Bradford utilisée pour le dosage des protéines est basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie lorsqu'il forme des complexes avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les acides aminés hydrophobes présents dans les protéines. Les formes cationiques (libres) du réactif sont rouge-marron. La forme anionique du réactif correspond à la forme liée aux protéines. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon (He, 2011).

➤ Mode opératoire

Le réactif de Bradford a été préparé en dissolvant 100 mg de bleu de coomassi G-250 dans 50 ml d'éthanol absolu et 100 ml d'acide phosphorique, le volume final a été porté à 1L avec de l'eau distillée.

Un volume de 1000 µl du réactif de Bradford a été ajouté à 20 µl de chaque extrait polysaccharidique préparé avec des dilutions convenables. Le mélange a été vortexé et l'absorbance a été mesurée après 5 min d'incubation à 595 nm (**Bradford, 1976**). Une courbe d'étalonnage établie par la BSA (**Annexe II**) a été utilisée pour la quantification des protéines.

II.5. Analyse des extraits polysaccharidiques par IRTF

Les spectres infrarouges des extraits polysaccharidiques déprotéinisé et non déprotéinisé ont été enregistrés dans la région spectrale 4000-400 cm⁻¹ à l'aide d'un spectrophotomètre IRTF.

II.6. Evaluation des propriétés fonctionnelles

Les propriétés fonctionnelles de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé des graines de *P. pinea* L. ont été évaluées en déterminant sa solubilité, ses propriétés émulsifiante et moussante ainsi que sa capacité de rétention d'eau/huile.

II.6.1. Solubilité

La solubilité a été évaluée comme décrit par **Zhu et al. (2017)** avec quelques modifications. Une masse de 0.1 g d'extrait a été placée dans un tube conique et pesé. Un volume de 10 ml d'eau distillée a été ajouté au tube suivi d'une incubation à 90 min. Chaque 30 min, le mélange a été vortexé pendant 5 s. la suspension a été centrifugée à 8000g pendant 15 min, le surnageant a été éliminé et le tube a été séché dans une étuve à 55°C et pesé à nouveau.

La solubilité a été mesurée comme suit:

$$\text{Solubilité (\%)} = (M_0 - M_1) / M_0 \times 100$$

Avec :

M_1 : Masse du résidu séché.

M_0 : masse initial de l'extrait polysaccharidique.

II.6.2. Capacité de rétention d'eau/huile

Les capacités de rétention d'eau et d'huile ont été déterminées comme décrit par **Zhu et al. (2017)**. Une masse de 0,5 g d'extrait polysaccharidique a été mise dans un tube conique, pesé et 10 ml d'eau/huile a été ajoutée au tube; les mélanges ont été incubés pendant 90 min en les vortex toutes les 30 min pendant 5 s. Les mélanges ont ensuite été centrifugés et les surnageants ont été éliminés. Les tubes ont été séchés dans une étuve à 55°C et pesés à nouveau.

La capacité de rétention d'eau/huile a été mesurée comme suit:

Avec :

$$\text{capacité de rétention d'eau/huile (g/g)} = (M_1 - M_0) / M_0 \times 100$$

M_1 : Masse du résidu séché.

M_0 : Masse de tube après séchage.

II.6.3. Propriétés émulsifiantes

La capacité émulsifiante et la stabilité d'émulsion ont été évaluées comme décrit par **Wang et al. (2018)** avec quelques modifications. Un volume de 10 ml de la suspension polysaccharique à une concentration de 0,5 % (m/v) a été mixé avec 3 ml d'huile de tournesol à l'aide d'un mixeur électrique à une vitesse de 10000 rpm pour 5 min. le mélange a été centrifugé à 1000g pendant 10 min. la capacité émulsifiante a été mesurée comme suit :

$$\text{Capacité émulsifiante (\%)} = (\text{volume d'émulsion} / \text{volume total}) \times 100$$

La stabilité d'émulsion a été déterminée en chauffant l'émulsion à 80°C pendant 30 min suivi par une centrifugation à 1000g pendant 10 min. la stabilité d'émulsion a été calculé par la formule suivante:

$$\text{Stabilité d'émulsion (\%)} = (\text{volume d'émulsion final} / \text{volume total}) \times 100$$

II.6.3. Propriétés moussantes

La capacité moussante et la stabilité de la mousse ont été évaluées comme décrit par **Wang et al. (2018)** en y apportant quelques modifications. La suspension polysaccharique à une concentration de 1% (m/v) a été homogénéisée à l'aide d'un batteur électrique pour 5 min. le volume de la mousse a été mesuré à 0 min pour déterminer la capacité moussante de l'extrait et à 30 min pour déterminer la stabilité de la mousse après 30 min de repos à température ambiante.

La capacité moussante et la stabilité de la mousse ont été calculées comme suit :

$$\text{Capacité moussante (\%)} = (\text{volume de mousse initial} / \text{volume total de suspension}) \times 100$$

$$\text{Stabilité de la mousse (\%)} = (\text{volume de la mousse final} / \text{volume total de suspension}) \times 100$$

II.7. Evaluation des activités biologiques

II.7.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Le test de piégeage du radical libre ABTS et le test de la réduction de fer (FRAP) ont été les tests *in vitro* réalisés afin d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé.

II.7.1.1. piégeage du radical libre ABTS^{•+}

➤ Principe

Le test ABTS mesure l'activité relative des antioxydants à piéger le radical ABTS^{•+} généré par une réaction entre le sel ABTS^{•+} et persulfate de potassium. La réduction du radical ABTS^{•+} qui a une couleur bleu verte par des antioxydants donneurs d'hydrogène est caractérisée par la décoloration du mélange (Djeridane et al., 2006).

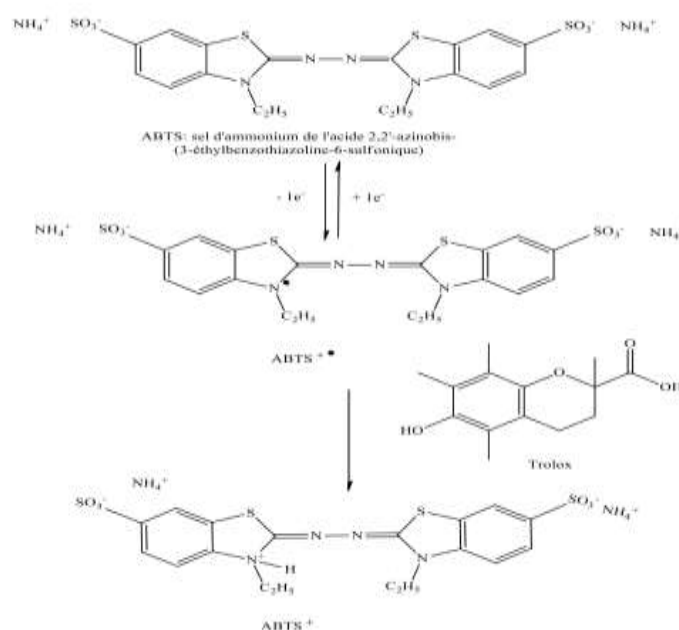


Figure 13: Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H• (Marc et al., 2004).

➤ Mode opératoire

La capacité de l'extrait polysaccharidique à piéger le radical ABTS a été réalisée comme décrit par **Re et al. (1999)** avec quelques modifications. La solution mère d'ABTS comprenait une solution d'ABTS de 7 mM et une solution de persulfate de potassium de 2,45 mM préparées dans de l'eau distillée. La solution de travail a ensuite été préparée en mélangeant les deux solutions à des volumes égaux et en les laissant réagir pendant 16h à l'obscurité et à température ambiante.

Une solution fraîche d'ABTS diluée a été préparée en mélangeant 2 ml de solution mère avec 200 ml d'éthanol absolu pour obtenir une absorbance de 0,700 à 734 nm.

Une série de concentration de l'extrait polysaccharidique a été préparée (1, 2, 4, 6, 8 et 10 mg/ml) et un volume de 25 µl de chaque concentration 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 des antioxydants synthétiques (Acide ascorbique, BHT et BHA) été comparée à celle de l'extrait.

➤ Expression des résultats

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

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

Avec :

A₀ : Absorbance du contrôle (sans extrait).

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

L'IC₅₀ représente la concentration d'extrait qui neutralise 50% du radical d'ABTS. L'IC₅₀ a été déterminée à partir de la courbe de variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait. La valeur d'IC₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée (Boubekri, 2014).

II.7.1.2. Pouvoir réducteur de fer

➤ Principe

La méthode de FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique Fe³⁺ en ion ferreux Fe²⁺. La présence d'agents réducteurs dans les extraits des plantes entraîne la réduction du complexe Fe³⁺/ferricyanure en forme ferreux. Par conséquent, le Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en suivant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyan dans le milieu réactionnel à 700 nm (Dudonne et al., 2009).

➤ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des extraits a été déterminé comme décrit par Oyaizu (1986). Un volume de 80 µl d'échantillon préparé à des différentes concentrations (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 de ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] à 1%. Après une incubation à 50 °C pendant 20 minutes, un volume de 250

μl d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % a été ajouté au milieu réactionnel afin de stopper la réaction, les tubes ont ensuite été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, 500 μl du surnageant de chaque tube a été mélangé avec 100 μl d'une solution de FeCl_3 à 0,1% et laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 10 minutes avant de mesurer les absorbances à 700 nm.

➤ Expression des résultats

un pouvoir réducteur élevé de l'extrait testé correspond à une augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel (Beddou, 2015). Le pouvoir réducteur de l'extrait polysaccharidique a été comparé à celle de l'acide ascorbique, BHT et BHA.

II.7.2. Evaluation de l'activité anti-hémolytique

Le pouvoir de l'extrait polysaccharidiques des graines de *P. pinea* L. à empêcher l'hémolyse induite par un stress osmotique et thermique à était l'objectif de cette étude.

II.7.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

La suspension érythrocytaire a été préparée en centrifugeant le sang collecté à 3000 rpm pendant 10 min et en préparant à partir du culot (globule rouge), après l'avoir lavé 3 fois avec du tampon phosphate (PBS) (pH 7,5, NaCl 0,9%), une suspension érythrocytaire à 2% (GRh : PBS).



Figure 14: photo originale de la suspension érythrocytaire préparée

II.7.2.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique

L'exposition de l'érythrocyte à un stress hypotonique aboutit à la lyse de sa membrane, ce qui conduit au relargage de l'hémoglobine. L'objectif du présent test est d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait polysaccharidique vis-à-vis des cellules érythrocytaires ayant subi ce stress osmotique par des solutions du PBS supplémentées par du NaCl à différentes concentrations (0,5, 0,7, 0,9 %).

➤ Mode opératoire

Le pouvoir protecteur de l'extrait polysaccharidique vis-à-vis de l'hémolyse induite par un stress osmotique a été évalué comme décrit par de Freitas et al. (2008) avec quelques

modifications. Un volume de 3ml de la suspension érythrocytaire à 2 % a été mélangé avec 3 ml du tampon phosphate salin (pH7.5) supplémentées avec NaCl à des concentrations variables (0.5, 0.7, 0.9 %), dans laquelle l'extrait à différentes concentrations été préparé (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg/ml).

Après une incubation de 30 min à 37 °C sous agitation douce, les tubes ont été centrifugés à 2000 rpm pendant 10 min et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm.

L'activité anti-hémolytique d'acide salicylique (un anti-hémolytique de référence) a été évaluée dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'extrait polysaccharidique.

➤ Expression des résultats

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

$$\text{Inhibition d'hémolyse (\%)} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

Avec:

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

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



Figure 15 : photo originale des échantillons à différentes concentrations

II.7.2.3. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique

L'étude de l'activité protectrice de l'extrait polysaccharidique vis-à-vis de l'hémolyse induite par un stress thermique a été réalisée par la méthode décrite par **Sakat et al. (2010)**. Un volume de 3ml d'extrait à des différentes concentrations (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg/ml) préparées dans du tampon phosphate salin (pH 7,5 ; NaCl 0,9 %) a été mélangé avec 3ml de suspension érythrocytaire à 2 %, le mélange a été incubé à 56°C pendant 30 min, puis centrifugés pendant 10 min à 2000 rpm. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm.

Le contrôle positif a été préparé en remplaçant l'eau physiologique par de l'eau distillée qui provoque une hémolyse totale.

L'effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique a été comparé à celui 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.

Partie III :
Résultats et Discussion

I. Rendement d'extraction des polysaccharides

L'extraction des polysaccharides des graines de *P. pinea* L. a été suivie de leur précipitation à l'aide de l'acétone. Pour une purification ultérieure, la fraction polysaccharidique récupérée après précipitation a été soumise à une déprotéinisation. Au vu des résultats obtenus, deux fractions polysaccharidiques, déprotéinisé et non déprotéinisé, ont été évaluées pour leur rendement d'extraction et leur composition biochimique. Le rendement d'extraction des deux fractions polysaccharidiques des graines de *P. pinea* L. est présenté dans le tableau II.

Table II: le rendement d'extraction des polysaccharides

Taux de rendement en (%)	
P. Déprotéinisé	P. non déprotéinisé
1,8 ± 0,122	2,06 ± 0,735

Le rendement d'extraction a été calculé par rapport à la masse totale de la poudre végétale délipidée. Le rendement d'extraction le plus élevé est enregistré pour la fraction polysaccharique non déprotéinisé, soit 2,06 ± 0,735 %. La fraction polysaccharidiques déprotéinisé a un rendement d'extraction plus faible de 1,8 ± 0,122%, la diminution du rendement après la déprotéinisation par la méthode de CaCl_2 indique que les protéines ont été éliminées de l'extrait. Le rendement d'extraction de la fraction déprotéinisé est inférieur à celui rapporté par **Abbou et al., (2020)** pour les graines de *P. halepensis* mill., soit 2,204 %, et beaucoup plus faible pour celui des graines de *Cassia obtusifolia*, soit 8,17 % (**Wu et al., 2019**), et de *Prunus amygdalus*, soit 9 % (**Dammak et al., 2018**).

La différence dans le rendement d'extraction peut être expliquée par différentes raisons, citant, l'état physiologique de la plante, la saison et la période de la récolte, et les différentes conditions expérimentales. Les polysaccharides étant des métabolites primaires, ils sont souvent utilisés comme précurseurs d'autres métabolites secondaires et comme source d'énergie. De nombreuses conditions expérimentales peuvent affecter le rendement de l'extraction, comme le type d'extraction, le volume d'alcool utilisé pour la précipitation, entre autres, mais le paramètre le plus influent est la température. Une augmentation de la température d'extraction permet l'accroissement de la solubilité et la diffusivité du soluté et de diminuer la viscosité. Cependant, la température doit être limitée afin d'éviter la dégradation thermique du soluté et l'extraction d'autres composants nuisibles (**Ebringerova et al., 2003, Bousbia 2011**).

II. Composition chimique des fractions polysaccharidiques

La composition en sucres totaux et protéines des deux extraits polysaccharidiques des graines de pin pignons est présenté dans la **figure 16**. Les teneurs en protéines et en sucres totaux de l'extrait polysaccharidique non déprotéinisé sont respectivement de $33,762 \pm 1,518\%$ et $46,929 \pm 0,217 \%$, tandis que pour l'extrait polysaccharidique déprotéinisé, elles sont de $77,529 \pm 1,109\%$ pour les sucres totaux et $6,404 \pm 0,276 \%$ pour les protéines. En comparant la composition des deux extraits, il est clair que la déprotéinisation de l'extrait polysaccharidique a été réussie, la teneur en protéines a diminué de $33,762 \pm 1,518\%$ à $6,404 \pm 0,276 \%$ ce qui a conduit à l'augmentation de la teneur en sucre totaux.

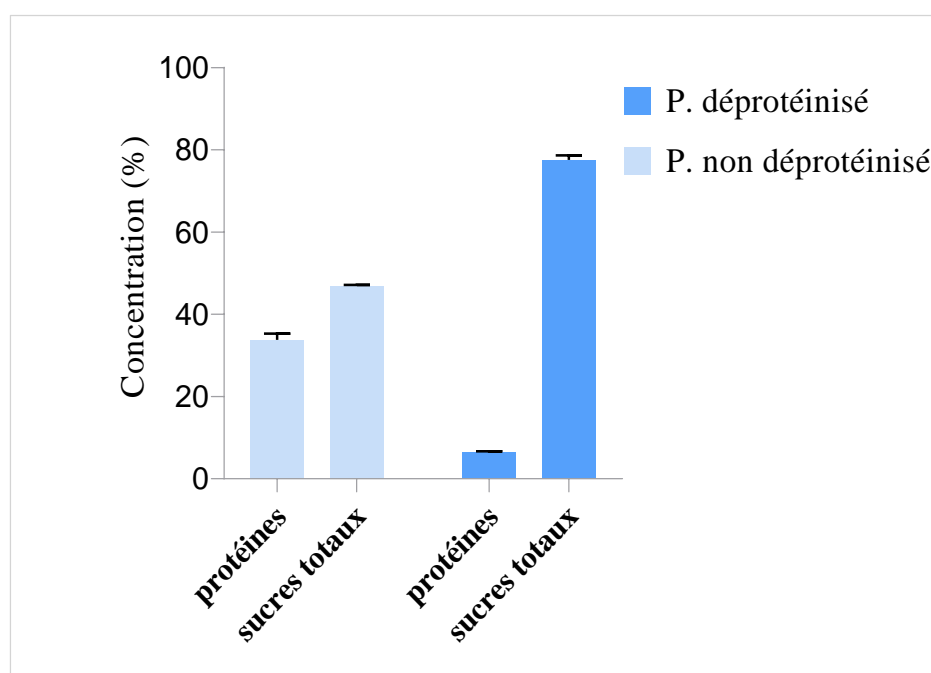


Figure 16 :Composition des fractions polysaccharidiques en sucres totaux et protéines.

Une teneur en sucre inférieure a été rapportée pour les polysaccharides des graines de pin d'Alep après déprotéinisation (65,43%)(**Abbou et al., 2020**), de même pour les polysaccharides extraits de cônes de trois espèces différentes du genre *Pinus*, la teneur en sucre était inférieure à celle rapportée dans notre cas avec une teneur en sucre de 41,33% pour les polysaccharides de *P. koraiensis*, 33% pour ceux de *P. sylvestris* et 42% pour ceux de *P. armandii*(**Xu et al., 2012**). En revanche, une teneur en sucre plus élevée a été rapportée pour les polysaccharides déprotéinisés du concombre (88.2 %) ainsi qu'une teneur en protéines plus faible que celle rapportée dans la présente étude (4.7 %)(**Chen et al., 2018**). Similaire à **Abbou et al., (2020)** qui ont également rapporté une teneur en protéines plus faible (1.54 %) pour les polysaccharie de *P.halepensis* mill indiquant que la déprotéinisation dans notre cas était moins performante que dans leur cas.

Cette variation peut être expliquée par les différents facteurs qui peuvent influencer la composition brute des extraits, à savoir la température, le rapport solvant/échantillon, le type de polysaccharides et la méthode d'extraction utilisée (ZOBIRI and HAMAITI 2019).

III. Analyse IR-TF des extraits polysaccharidique déprotéinisé et non déprotéinisé

L'analyse infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) des polysaccharides extraits des graines de *Pinus pinea* L. a révélé qualitativement la présence de groupes fonctionnels caractéristiques.

La figure 17 montre les spectres IRTF des extraits polysaccharidiques déprotéinisé et non déprotéinisé.

Les pics les plus intenses des extraits polysaccharidiques déprotéinisé et non déprotéinisé sont 3293 et 3331 cm^{-1} attribués à la vibration d'étirement des groupes hydroxyle (OH) (Branden and Tooze 2012), les pics à 2929 et 2933 cm^{-1} correspondent à l'adsorption C-H qui inclut CH, CH₂, et CH₃ (Branden and Tooze 2012, Shi *et al.*, 2016), les pics à 1648 et 1635 cm^{-1} correspondent aux groupes C=O (Barka *et al.*, 2013).

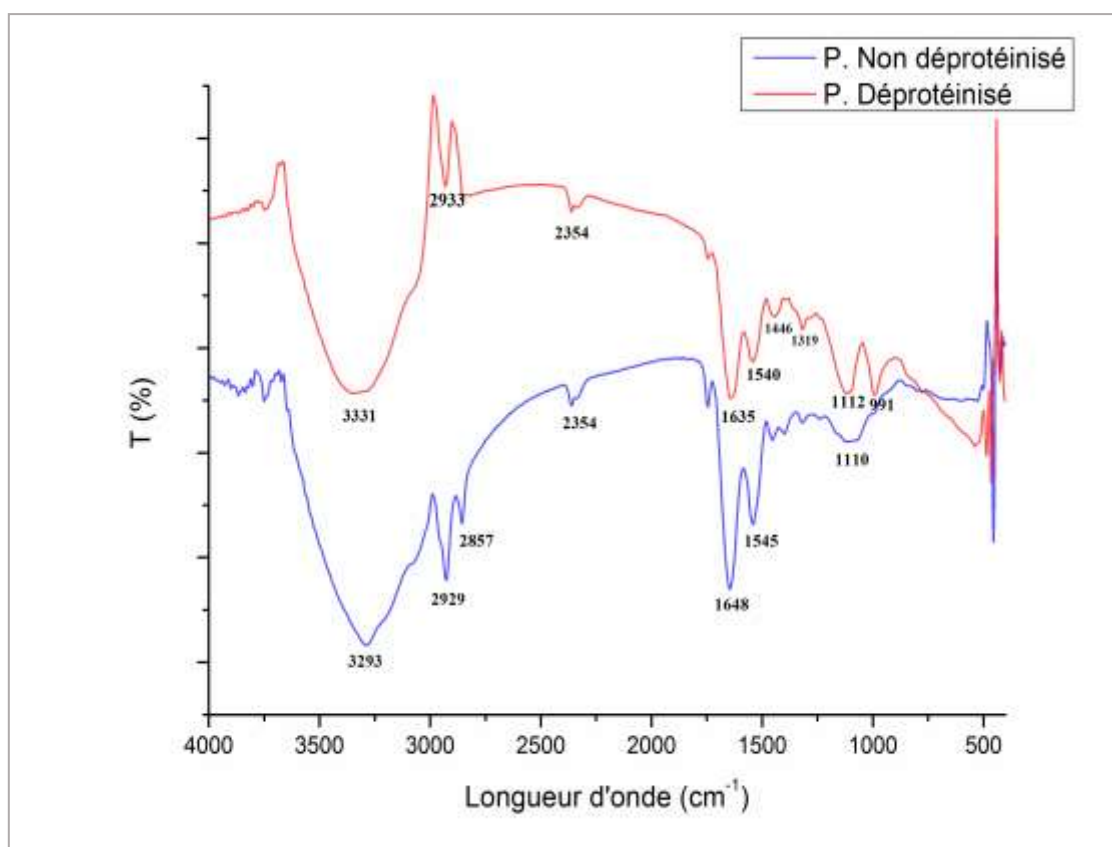


Figure 17 : Spectres IRTF des extraits polysaccharidiques déprotéinisé et non déprotéinisé des graines de *Pinus pinea* L.

Les pics à 1545 et 1540 cm^{-1} ne sont que des impuretés (eau, protéines ou certains polyphénols) (Shi *et al.*, 2016, Lee *et al.*, 2015), les pics à 1110 et 1112 cm^{-1} sont spécifiques des vibrations des liaisons C-O-C et C-O-H des structures polysaccharidiques (Schmitt and Flemming 1998). Le pic à 2354 cm^{-1} observé dans les deux extraits est attribué au groupe amine (Ahluwalia and Goyal 2005).

Le pic obtenu à 2857 cm^{-1} , qui est présent uniquement dans le spectre de l'extrait de non déprotéinisé, est spécifique des vibrations de la liaison C-H (Sharifian-Nejad and Shekarchizadeh 2019). Les pics qui sont présents dans le spectre de l'extrait déprotéinisé et qui n'existe pas dans le spectre du celui non déprotéinisé sont le pic à 1446 cm^{-1} qui désigne le groupe C=O (Barka *et al.*, 2013), le pic à 1319 cm^{-1} qui peut être considéré comme spécifique de la vibration d'élongation du groupe carboxylate, tandis que le pic à 991 cm^{-1} indique la présence d'esters de sulfate (SO) (Shi *et al.*, 2016).

La différence dans les spectres est liée à la présence et à l'absence de la fraction protéique.

IV. Propriétés fonctionnelles de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé

IV.1. Solubilité et capacité de rétention d'eau et d'huile

La solubilité, la capacité de rétention d'eau et la capacité de rétention d'huile de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé sont représentées dans le **tableau III**.

La solubilité des échantillons peut affecter les interactions polysaccharide-polysaccharide et polysaccharide-eau. D'après le **tableau III**, l'extrait polysaccharidique déprotéinisé des graines de *P. Pinea* L. a une solubilité de 100 %, ce qui indique que l'extrait polysaccharidique est soluble dans l'eau.

La température de l'extraction a été signalée comme affectant la solubilité des polysaccharides, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la solubilité. Ceci est dû à la rupture des liaisons entre les molécules de polysaccharides sous l'effet de la température qui les rend disponibles aux groupes OH de l'eau et augmente ainsi la solubilité. En outre, l'interaction entre l'eau et les polysaccharides est influencée par la liaison hydrogène, la température et la taille des particules (Sharifian-Nejad and Shekarchizadeh 2019, Zhu *et al.*, 2017).

Table III: Solubilité, la capacité de rétention d'eau et la capacité de rétention d'huile de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé

Solubilité (%)	Capacité de rétention d'eau (g/g)	Capacité de rétention d'huile (g/g)
100 ± 0,00	0 ± 0,00	5,6 ± 0,132

La capacité de rétention d'eau des extraits de polysaccharides s'est avérée être de 0 ± 0.00 g/g, tandis que leur capacité de rétention d'huile était de $5,6 \pm 0,132$ g/g.

La capacité de rétention d'eau représente la quantité d'eau retenue et absorbée par l'échantillon hydraté, et elle est utilisée pour évaluer la stabilité, la texture et l'aspect sensoriel de l'échantillon. L'incapacité des polysaccharides des graines de *P. pinea* L. à fixer l'eau pourrait être liée à leur solubilité, leur interaction avec l'eau entraîne une solubilisation complète qui pourrait expliquer leur incapacité à retenir l'eau (Zhu *et al.*, 2017).

La capacité de rétention d'huile, caractéristique importante des polysaccharides, est liée à l'adsorption des composés organiques à la surface du substrat. Cette propriété fonctionnelle est indirectement proportionnelle à la composition chimique, mais largement liée à la porosité de la structure de la molécule plutôt qu'à l'affinité de la molécule pour l'huile (Zhu *et al.*, 2017).

IV.2. Propriétés émulsifiantes et moussantes

Les propriétés d'émulsion et de moussage de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé des graines de *P. pinea* L. sont présentées dans le **tableau IV**.

L'extrait polysaccharidique préparé à une concentration de 0,5 % a présenté une activité émulsifiante de $27,27 \pm 1,061$ % et une stabilité d'émulsion de $25 \pm 0,947$ %. Les propriétés d'émulsion des polysaccharides ont été rapportées comme étant principalement liées aux molécules de sucre, aux composants aqueux résiduels de la protéine hydrophobe ou aux caractéristiques rhéologiques (Wang *et al.*, 2018).

La stabilité de l'émulsion pendant le stockage est une caractéristique importante, elle a un effet positif sur la stabilité physique des émulsions telle que la floculation, la coalescence et la séparation gravitationnelle (Sharifian-Nejad and Shekarchizadeh 2019).

Les auteurs ont rapporté que les polysaccharides, comparés aux protéines, ont une activité émulsifiante plus faible, ce qui est dû à l'hydrophilie, à la faible flexibilité et à la répétition uniforme de l'unité constitutive du polysaccharide(Sharifian-Nejad and Shekarchizadeh 2019).

Table IV: Propriétés émulsifiantes et moussantes de l'extrait polysaccharidique déprotéiné

Propriétés émulsifiantes		Propriétés moussantes	
Capacité émulsifiante (%)	stabilité de l'émulsion (%)	Capacité moussante (%)	Stabilité de la mousse (%)
27,27 ± 1,061	25 ± 0,947	58,33 ± 1,312	24 ± 1,119

La capacité de moussage et la stabilité de la mousse des polysaccharides préparés à une concentration de 1% (m/v) étaient respectivement de $58,33 \pm 1,312$ % et $24 \pm 1,119$ %. Il a été rapporté qu'une capacité de moussage élevé est probablement liée à la teneur élevée en protéines (Zhu *et al.*, 2017). Les propriétés de moussage sont étroitement liées à la teneur en protéines et en sucres, au poids moléculaire, à la structure et à la présence de composés supplémentaires dans le polysaccharide(Wang *et al.*, 2018). La faible stabilité de la mousse pourrait être attribuée à l'incapacité des polysaccharides à former un réseau qui stabilise le film interfacial(Wang *et al.*, 2018).



Figure 18:Photo représentant de la mousse formée par les polysaccharides et la stabilité de cette mousse après 30 min.

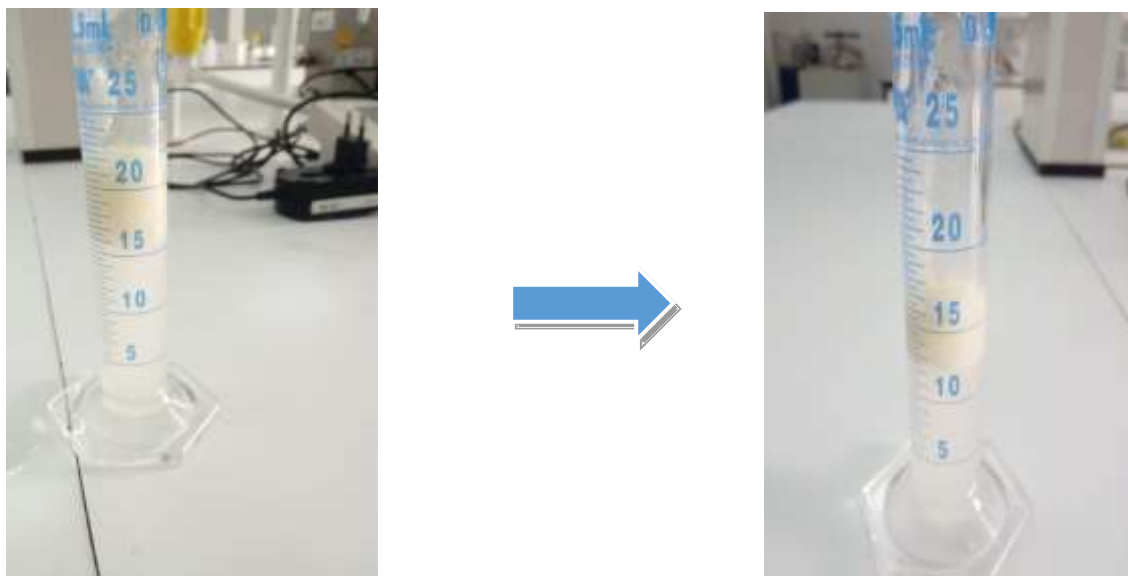


Figure 19 : Photo représentant de la capacité émulsifiante des polysaccharides et la stabilité de l'émulsion après 30 min.

V. Activités biologiques de l'extrait polysaccharidique déprotéinisé

V.1. Activité antioxydante

V.1.1. Test de piégeage du radical libre ABTS

Le test ABTS est un test de décoloration applicable aux antioxydants lipophiles et hydrophiles à différents niveaux de pH. Les résultats de l'activité de piégeage du radical ABTS de l'extrait polysaccharidique et de l'acide ascorbique ainsi que du BHA et du BHT sont présentés dans les **figures 20 et 21**.

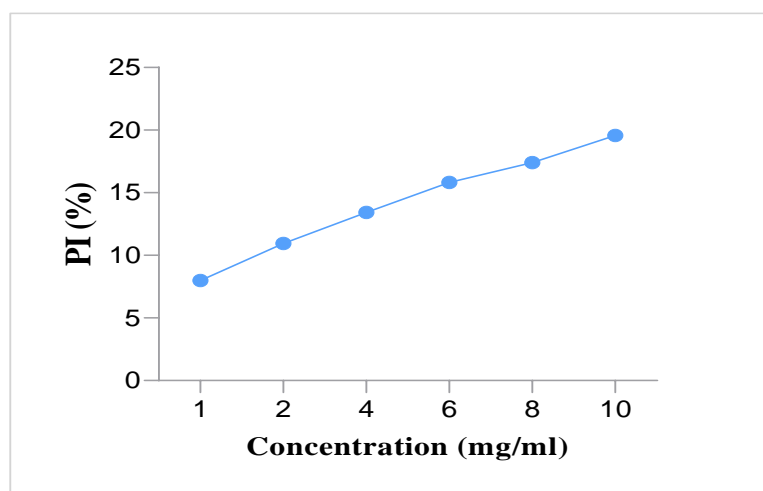


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de radical ABTS à différentes concentrations de l'extrait polysaccharidique.

D'après les **figures 20 et 21** on observe que la capacité de l'extrait polysaccharidique ainsi que des standards d'antioxydants synthétiques à éliminer le radical augmente avec l'augmentation de la concentration. Le pourcentage d'inhibition (PI) de l'extrait polysaccharidique a augmenté en augmentant la concentration jusqu'à atteindre $19,568 \pm 0,451$ % à une concentration de 10 mg/ml ce qui est immensément inférieur à celui de l'acide ascorbique qui à une concentration de 0,1 mg/ml a atteint un PI de $84,179 \pm 1,794$ % ainsi que pour le BHT et le BHA qui ont atteint respectivement un PI de $99,47 \pm 0,132$ % et $99,51 \pm 0,274$ % à une concentration de 0,8 mg/ml. Ces résultats indiquent que l'extrait polysaccharidique ne présente pas d'activité à neutraliser le radical ABTS.

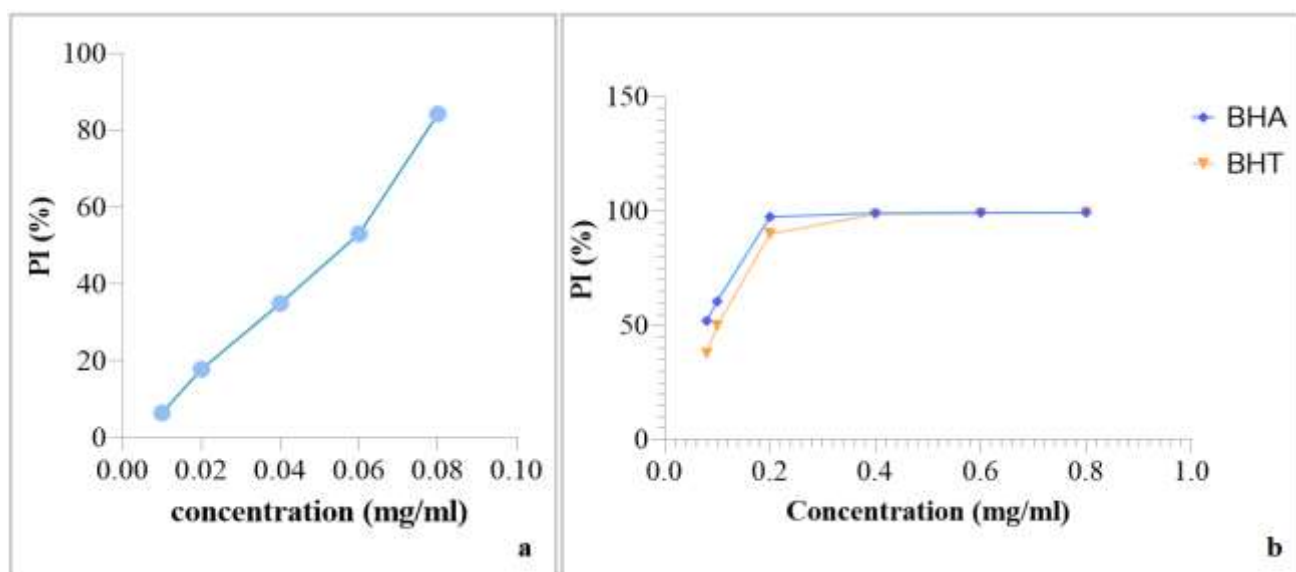


Figure 21 : Pourcentage d'inhibition de radical ABTS à différentes concentrations de l'acide ascorbique (a) et du BHA et BHT (b).

La concentration inhibitrice (IC_{50}) est définie comme la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du radical ABTS en solution, les valeurs d' IC_{50} pour le BHA, le BHT et l'acide ascorbique sont respectivement de 0,081, 0,1 et 0,056 mg/ml, alors que pour l'extrait polysaccharidique est indéterminée puisqu'elle n'a pas atteint un PI de 50% même en augmentant la concentration à 10 mg/ml (**Tableau V**). Plus la valeur IC_{50} est faible, plus l'extrait est efficace pour neutraliser le radical ABTS (Yang *et al.*, 2012), d'après les résultats obtenus, l'antioxydant le plus efficace est l'acide ascorbique suivi du BHT et du BHA.

Table V: La concentration inhibitrice (IC_{50}) de l'extrait polysaccharidique et des antioxydants standards

	polysaccharides	Acide ascorbique	BHT	BHA
IC ₅₀ (mg/ml)	-	0,056	0,1	0,081

En comparant nos résultats avec les polysaccharides de la tige du poivron rouge, comme dans notre cas, leur capacité à neutralisé le radical ABTS était faible, à une concentration de 10 mg/ml, ils présentaient un PI de 38,1% (Yoo and Chang 2017). Les polysaccharides des graines de *Cassia* avaient un PI environ 62% à une concentration de 5 mg/ml (Wu *et al.*, 2019), tandis que les polysaccharides d'amandes à une concentration de 1,25 mg/ml, le PI était de 69,42% (Dammak *et al.*, 2018).

L'activité antioxydante des polysaccharides isolés de différentes parties du pin coréen, cône, aiguilles et écorce, s'est avérée plus élevée que celle rapportée dans la présente étude. À une concentration de 8 mg/ml, le PI des trois extraits de polysaccharides était supérieure à 50 % (Zhang *et al.*, 2017).

La différence dans le taux de piégeage des radicaux ABTS de notre extrait des extraits polysaccharides de *pinus koraiensis* de différentes parties peut être due à l'organe étudié, ainsi qu'à l'espèce. En général, les activités antioxydantes des polysaccharides sont liées à leur poids moléculaires, à leur composition en monosaccharides et à leur configuration. Les monosaccharides des polysaccharides agissent comme agent réducteur en fournissant de l'hydrogène qui se combine avec les radicaux libres pour former des composés stables qui mettent fin à la réaction (Zhang *et al.*, 2017).

En outre, les composés polyphénoliques présents dans l'extrait polysaccharidique peuvent également contribuer à l'activité antioxydante. Dans ce cas, la faible activité antioxydante pourrait être liée au manque ou à l'absence totale de composés polyphénoliques dans l'extrait polysaccharidique (Zhang *et al.*, 2017). La différence dans les taux d'inhibition peut également être attribuée à la variation des conditions de manipulation, à la qualité et à la concentration du radical utilisé dans le test antioxydant et aux conditions expérimentales (Dudonne *et al.*, 2009).

V.1.2. Pouvoir réducteur de fer

Le test FRAP prend part à une réaction de transfert d'électrons dans laquelle un sel ferrique est utilisé comme oxydant. Dans ce test, la couleur jaune de la solution testée se transforme en différentes nuances de vert et de bleu en fonction du pouvoir réducteur des échantillons antioxydants (Gülçin *et al.*, 2010). De nombreuses publications actuelles ont indiqué qu'il existe une relation directe entre les activités antioxydantes et le pouvoir réducteur des composants de certaines plantes (Bentabet *et al.*, 2014).

D'après les résultats présentés dans les figures 22, 23 et 24, il est observé que le pouvoir réducteur de Fe^{3+} est proportionnel à la concentration, que ce soit pour le BHA, le BHT, l'acide ascorbique ou l'extrait polysaccharidique des pignons de pin. Pour les mesures du pouvoir réducteur des polysaccharides des pignons de pin, la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} a été étudiée à différentes concentrations (1-10 mg/ml).

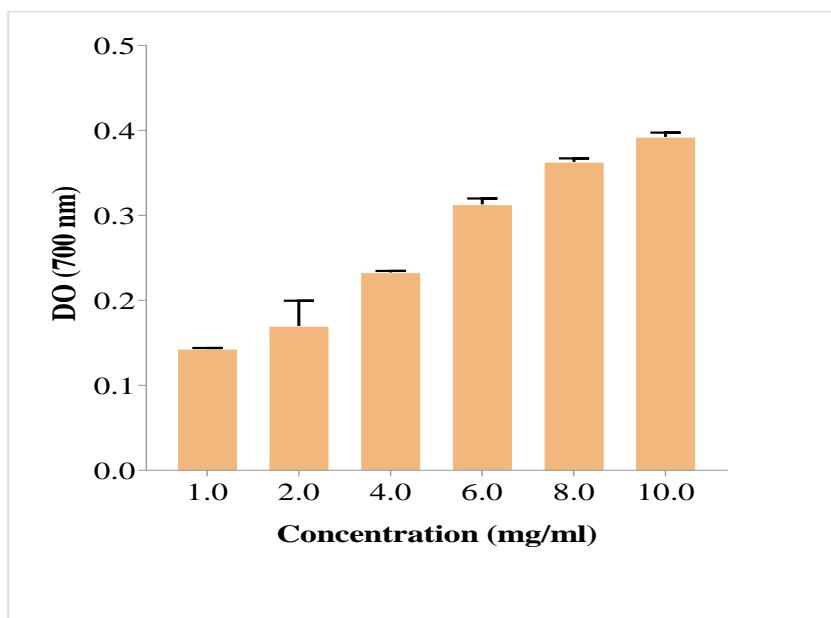


Figure 22 : Variation des DO du pouvoir réducteur de fer de l'extrait polysaccharidique.

Pour l'extrait polysaccharidique, la DO a augmenté en augmentant la concentration, elle est passée de $0,143 \pm 0,001$ à une concentration de 1 mg/ml à $0,3925 \pm 0,004$ à une concentration de 10 mg/ml. En comparant ces résultats avec ceux de l'acide ascorbique, ce dernier a présenté une DO de $0,3865 \pm 0,002$ à une concentration de 0,1 mg/ml indiquant la faible activité réductrice de l'extrait polysaccharidique étudié par rapport à un antioxydant synthétique.

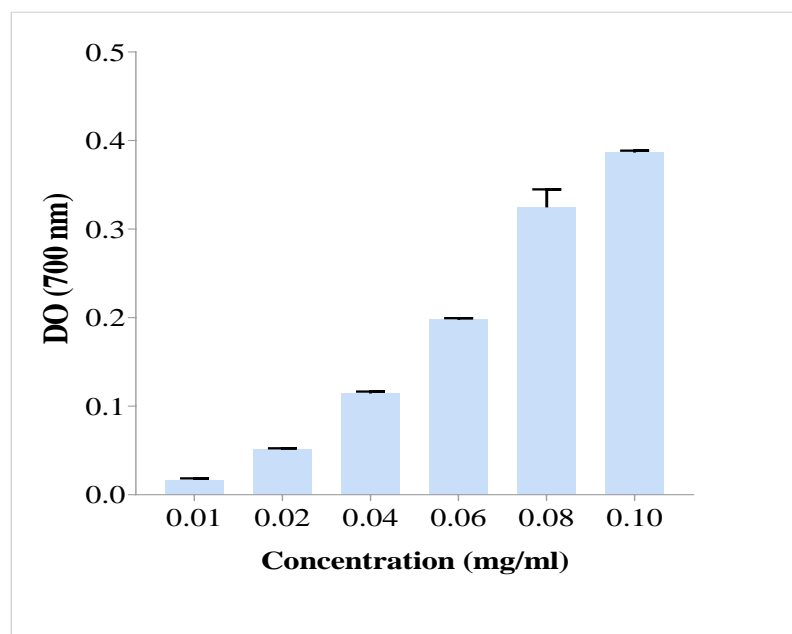


Figure 23 : Variation des DO du pouvoir réducteur de fer de l'acide ascorbique.

La même chose est observée pour le BHA et le BHT, l'activité réductrice des deux antioxydants est plus élevée que celle de l'extrait polysaccharidique. Le BHA a présenté une DO de $2,4905 \pm 0,001$ à une concentration de 0,8 mg/ml. Il est intéressant de noter que l'activité réductrice de le BHT est moins efficace que celle du BHA, il a présenté une DO de $0,570 \pm 0,004$ à la même concentration. Ces résultats indiquent que les polysaccharides des pignons de pin ont une activité réductrice faible et peu efficace.

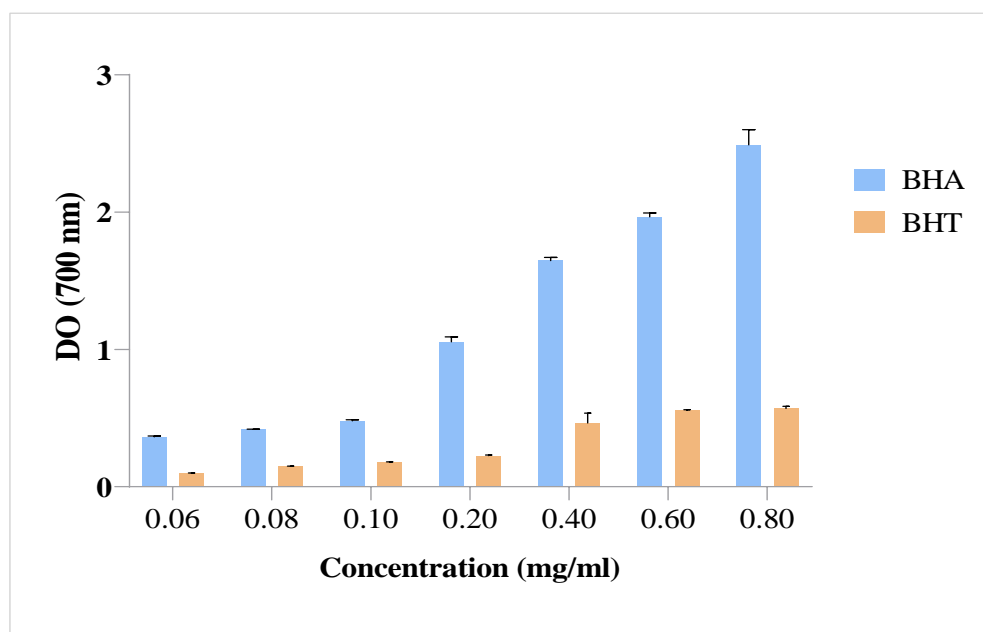


Figure 24: Variation des DO du pouvoir réducteur de fer du BHA et BHT.

On peut conclure que le pouvoir réducteur des extraits de plantes est probablement dû à la présence de groupes hydroxyles dans les composés polysaccharides qui peuvent servir de donneurs d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et des inactivateurs d'oxydants. Certaines études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Bougandoura and Bendimerad 2012).

V.2. Activité anti-hémolytique

V.2.1. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress osmotique

Dans la présente étude, le stress osmotique dans les globules rouges a été induit par 0,5, 0,7 et 0,8 % de NaCl. 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 le globule rouge conduit à son gonflement puis à sa rupture et à la libération de son contenu cytoplasmique, notamment l'hémoglobine (phénomène d'hémolyse). Ce phénomène est observé à des concentrations de NaCl inférieures à 0,9%.

L'effet de l'extrait de polysaccharidique des graines de *P. pinea* L. sur la lyse osmotique des globules rouges est déterminé en mesurant l'inhibition de l'hémolyse à des concentrations croissantes de solutions salines (0,5%, 0,7%, 0,8% de NaCl).

L'inhibition de l'hydrolyse (%) de l'extrait polysaccharidique contre l'hémolyse induite par des solutions salines à différentes concentrations est illustrée dans la **figure 25**, les résultats ont été comparés à ceux de l'acide salicylique utilisé comme un anti-hémolytique de référence (**figure 26**).

D'après les **figures 25 et 26**, le pourcentage de protection de l'extrait polysaccharidique et de l'acide salicylique a augmenté de manière proportionnelle avec l'augmentation de la concentration. L'extrait polysaccharidique, comparé à l'acide salicylique, avait une meilleure protection contre l'hémolyse induite par des solutions hypotoniques. À une concentration de 1 mg/ml, l'extrait polysaccharidique des graines de *P. pinea* L. avaient un pourcentage de protection de $98,452 \pm 0,788$ %, $88,792 \pm 1.663$ % et 99.405 ± 0.087 % pour des concentrations de NaCl de 0,5, 0,7 et 0,9 %, respectivement, tandis que l'acide salicylique, pour des concentrations de NaCl de 0,5, 0,7 et 0,9 % et à une concentration de 1 mg/ml, avait un pourcentage de protection de $88,36 \pm 0.158$ %, 83.445 ± 0.533 % et 53.020 ± 0.316 %, respectivement.

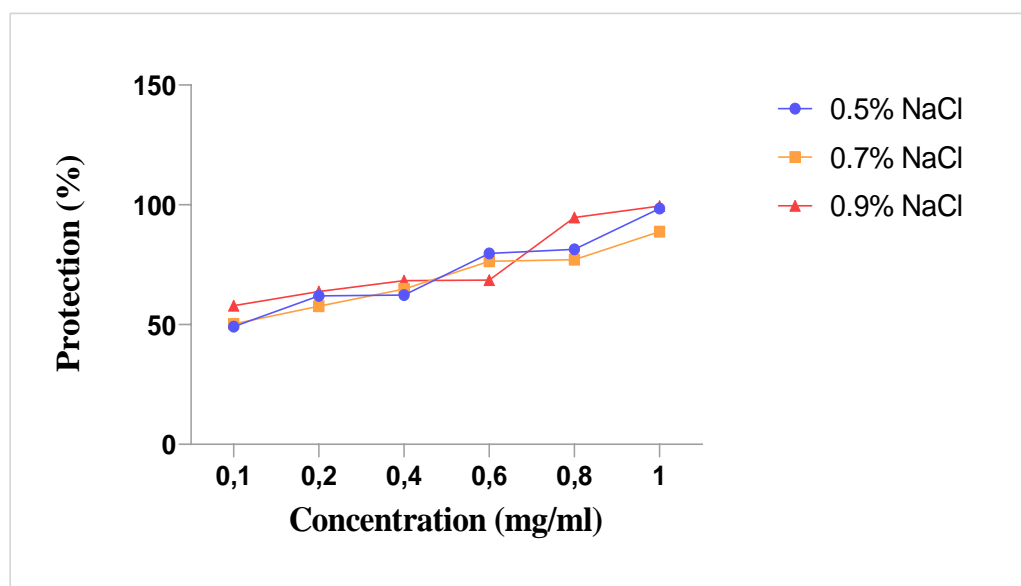


Figure 25 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations de l'extrait polysaccharidique.

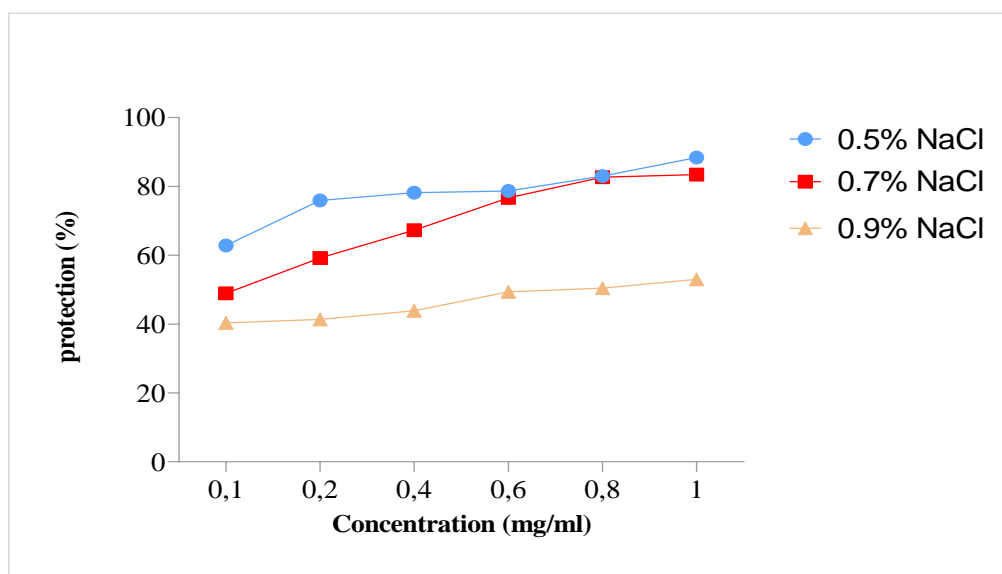


Figure 26 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis du stress osmotique en fonction des différentes concentrations d'acide salicylique.

En comparant nos résultats avec des extraits aqueux de *Pistacia lentiscus* et d'*Arbutus unedo*, ces derniers avaient un pourcentage de protection plus bas que l'extrait polysaccharidique de *P. pinea* L.. L'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* avait des pourcentages de protection de 70,78 % (0,5 % de NaCl), 71,95 % (0,7 % de NaCl) et 76,46 % (0,9 % de NaCl), tandis que celui de *Pistacia lentiscus* n'avait aucune activité jusqu'à une concentration de 3mg/ml (Moualek *et al.*, 2016, Ghenima *et al.*, 2015).

Il a été démontré que l'incorporation de polysaccharides dans la membrane érythrocytaire améliore la stabilité des érythrocytes contre la lyse hypotonique. Cette propriété peut s'expliquer par l'augmentation du rapport volume cellulaire/surface en augmentant la membrane érythrocytaire ou par la réduction du volume cellulaire en interagissant avec les protéines membranaires (Abbou *et al.*, 2020). En outre, cet effet protecteur peut être dû soit à la capacité des extraits à modifier le flux de calcium dans les érythrocytes, puisque la déformabilité et le volume cellulaire des érythrocytes sont étroitement liés à la teneur en calcium intracellulaire (Chopade *et al.*, 2012). Soit en se liant à des composants membranaires, notamment des protéines membranaires, contribuant ainsi à la régulation du volume d'eau intracellulaire en contrôlant le mouvement des ions sodium et potassium à travers des canaux protéiques (Umapathy *et al.*, 2010). Soit en induisant un changement ultérieur des charges à la surface de la membrane, ce qui peut empêcher l'interaction physique avec les agents d'agrégation ou favoriser la répulsion des charges (Dhibi *et al.*, 2014).

V.2.2. Effet protecteur de l'extrait vis-à-vis d'un stress thermique

Les érythrocytes exposés à des températures relativement élevées, se déforment progressivement pour devenir sphériques, et la perturbation de leurs membranes diminue leur capacité à résister à l'hémolyse (Gershfeld and Murayama 1988).

L'effet stabilisateur de l'extrait de polysaccharidique contre la lyse des érythrocytes induite par la chaleur est présenté dans la figure 1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection en fonction de la concentration de l'extrait et comparés à ceux de l'acide salicylique

D'après la **figure 27**, nous observons qu'en augmentant la concentration de l'extrait de 0,1 à 0,8 mg/ml, le pourcentage de protection augmente considérablement. L'extrait polysaccharidique des graines de *P. pinea* L. a montré une activité anti-hémolytique importante et dose dépendante avec un pourcentage de protection allant de $70,68 \pm 0,591$ % à $84,055 \pm 2,254$ %. Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux de l'acide salicylique, dont les pourcentages de protection allaient de $42,16 \pm 1,504$ % à $77,27 \pm 0,501$ %.

La même efficacité a été rapportée pour l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* (79,66 %)(Moualek *et al.*, 2016). En revanche, l'extrait aqueux d'*Operculina turpethum* a été rapporté comme ayant un pourcentage de protection de 42,86 % (Sharma and Singh 2013).

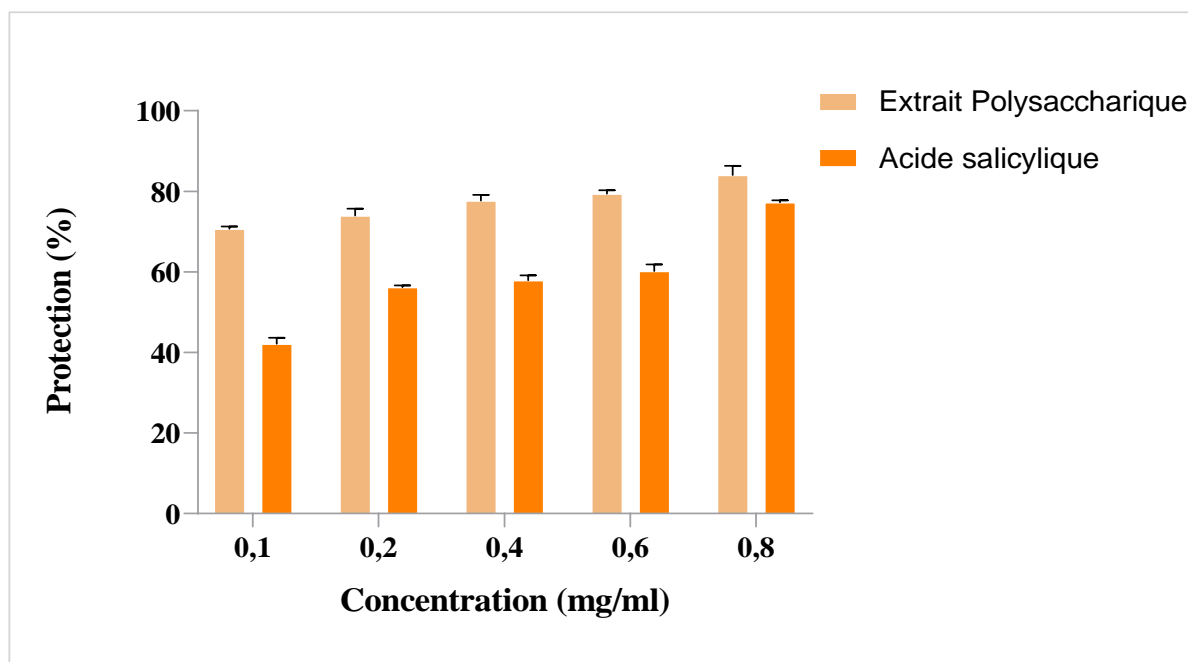


Figure 27 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis de du stress thermique en fonction des différentes concentrations d'acide salicylique et d'extrait polysaccharidique.

L'effet protecteur contre la lyse des érythrocytes 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**).

Le test d'hémolyse des érythrocytes est utilisé depuis longtemps en raison de la forte analogie entre les membranes des érythrocytes et des lysosomes ; les deux membranes possèdent une bicouche lipidique riche en protéines (50%) et en oligosaccharides. La stabilisation ou la déstabilisation de l'une entraîne nécessairement la stabilisation ou la déstabilisation de l'autre. Compte tenu de cette similitude, l'effet de l'extrait sur la stabilisation des globules rouges pourrait être extrapolé à la stabilisation de la membrane lysosomale. Cette stabilisation est importante pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération des constituants lysosomaux(**Kumar *et al.*, 2013**).

Conclusion générale et perspectives

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le règne végétal est une source inépuisable de molécules qui peuvent présenter un très grand intérêt dans différents domaines notamment médicinale, pharmaceutique, l'industrie alimentaire et cosmétique.

Notre étude est consacrée à l'extraction des polysaccharides des pignons de *Pinus pinea* L, le rendement de ces polysaccharides a été jugé comme satisfaisant.

L'activité antioxydante de l'extrait de polysaccharides a été évaluée par la méthode anti-radicalaire (test ABTS) et la méthode de pouvoir réducteur (FRAP) dont les résultats montrent que l'extrait possède une très faible activité antioxydante.

Pour l'étude de l'activité anti-hémolytique les résultats montrent que l'extrait de polysaccharides possède un effet protecteur relativement important vis-à-vis de l'hémolyse induite par un stress osmotique et thermique. Nous pouvons dire ainsi que l'extrait exprime un effet stabilisateur de la membrane du globule rouge.

Dans un second volet de notre étude, nous avons étudié les propriétés fonctionnelles de notre extrait polysaccharidique et on a trouvé qu'ils ont une bonne capacité de rétention d'huile ($5,6 \pm 0,132$ g d'huile / g d'échantillon) et n'ont pas une capacité de rétention d'eau, ce qui confirme son hydrosolubilité ($100 \pm 0,00$ %), ils possèdent aussi un pouvoir émulsifiant ($27,27 \pm 1,061\%$) et moussant ($58,33 \pm 1,312$ %) considérable.

Ces résultats restent préliminaire, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de cet effet anti-hémolytique, et pour connaître aussi les caractéristiques structurales qui permettent aux polysaccharides d'avoir ces propriétés fonctionnelles.

Ces études doivent être orientées vers l'identification qualitative et quantitative des composés polysaccharidiques présents dans cet extrait par des techniques analytiques plus performantes telles que la HPLC et la Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Références bibliographiques

Références bibliographique

- Abbou, A., Kadri, N., Dahmoune, F., Chergui, A., Remini, H., Berkani, F., Adel, K., Boukhalfa, F. & Madani, K. (2020). Optimising functional properties and chemical composition of *Pinus halepensis* Mill. Seeds protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, **100**, 105416.
- Abd El-Ghffar, E. A., Al-Sayed, E., Shehata, S. M., Eldahshan, O. A. & Efferth, T. (2018). The protective role of *Ocimum basilicum* L.(Basil) against aspirin-induced gastric ulcer in mice: Impact on oxidative stress, inflammation, motor deficits and anxiety-like behavior. *Food & function*, **9**, 4457-4468.
- Acket, S. (2015). Implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez les plantes oléagineuses-Lin: modélisation des systèmes. Université de Technologie de Compiègne.
- 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
- Adili, B. & Balandier, P. (2013). Influence of stand and tree attributes and silviculture on cone and seed productions in forests of *Pinus pinea* L. in northern Tunisia. *Options Méditerranéennes. Série A: Séminaires Méditerranéens*, **105**, 9-14.
- Agrimi, M., Ciancio, O (1993). SILVA MEDITERRANEA. In: Comité des questions forestières méditerranéennes "Pinus pinea" organisation des nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- Ahluwalia, S. & Goyal, D. (2005). Removal of heavy metals by waste tea leaves from aqueous solution. *Engineering in life Sciences*, **5**, 158-162.
- Akkemik, Ü. (2000). Dendroclimatology of umbrella pine (*Pinus pinea* L.) in Istanbul, Turkey.
- Angone, S. A., Nguema-Ona, E. & Driouich, A. (2010). La thérapie par les plantes en Afrique: activités immunostimulantes des polysaccharides de la paroi végétale. *Phytothérapie*, **8**, 223-230.
- Barka, N., Abdennouri, M., El Makhfouk, M. & Qourzal, S. (2013). Biosorption characteristics of cadmium and lead onto eco-friendly dried cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **1**, 144-149.
- 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.

- Benaoun, F. (2017). Caractérisation structurale et potentiel biologique des polysaccharides issus de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) et *Urginea noctiflora* Batt. Trab (Liliaceae). Université Clermont Auvergne(2017-2020).
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z. & 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.
- Boual, Z., Chouana, T., Kemassi, A., Oudjana, A. H., Bouhoun, M. D., Michaud, P. & El Hadj, M. O. (2015). Étude physicochimique et biologique des polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae). *Phytothérapie*, **13**, 396-402.
- Boubekri, C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Université Mohamed Khider, Biskra.
- Bougandoura, N. & Bendimerad, N. (2012). ANTIFUNGAL ACTIVITY OF AQUEUOUS AND METHANOL EXTRACTS OF *Satureja calaminthassp.*(*Nepeta*) briq. *Revue des bio ressources*, **2**, 7-7.
- Bousbia, N. (2011). Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Université d'Avignon.
- Boutaghane, N. (2013). Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254.
- Branden, C. I. & Tooze, J. (2012). Introduction to protein structure. Garland Science.
- CAESAR, M. L. N. (2007). titre.
- Cani, P. D., Lecourt, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., De Backer, F., Neyrinck, A. M. & Delzenne, N. M. (2009). Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *The American journal of clinical nutrition*, **90**, 1236-1243.
- Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C. & Attia, H. (2006). Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food science and technology international*, **12**, 407-415.
- Chen, F. & Huang, G. (2019). Antioxidant activity of polysaccharides from different sources of ginseng. *International journal of biological macromolecules*, **125**, 906-908.

- Chen, F., Sun, Y., Zheng, S.-L., Qin, Y., McClements, D. J., Hu, J.-N. & Deng, Z.-Y. (2017). Antitumor and immunomodulatory effects of ginsenoside Rh2 and its octyl ester derivative in H22 tumor-bearing mice. *Journal of Functional Foods*, **32**, 382-390.
- Chen, L., Huang, G. & Hu, J. (2018). Preparation, deproteinization, characterisation, and antioxidant activity of polysaccharide from cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International journal of biological macromolecules*, **108**, 408-411.
- Chen, Y., Liu, D., Wang, D., Lai, S., Zhong, R., Liu, Y., Yang, C., Liu, B., Sarker, M. R. & Zhao, C. (2019). Hypoglycemic activity and gut microbiota regulation of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa* in type 2 diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*, **126**, 295-302.
- 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.
- Chouana, T. (2017). Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'*Astragalus gombo bunge*. Université Clermont Auvergne(2017-2020).
- Collic-Jouault, S., Zanchetta, P., Helley, D., Ratiskol, J., Siquin, C., Fischer, A. & Guezennec, J. (2004). Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en thérapeutique humaine. Elsevier Masson.
- Correia, A. C., Tomé, M., Pacheco, C., Faías, S., Dias, A., Freire, J., Carvalho, P. O. & Pereira, J. S. (2010). Biomass allometry and carbon factors for a Mediterranean pine (" *Pinus pinea*" L.) in Portugal. *Forest Systems*, **19**, 418-433.
- Dammak, M. I., Chakroun, I., Mzoughi, Z., Amamou, S., Mansour, H. B., Le Cerf, D. & Majdoub, H. (2018). Characterization of polysaccharides from *Prunus amygdalus* peels: Antioxidant and antiproliferative activities. *International journal of biological macromolecules*, **119**, 198-206.
- 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.
- Delattre, C., Pierre, G., Gardarin, C., Traïkia, M., Elboutachfai, R., Isogai, A. & Michaud, P. (2015). Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. *Carbohydrate polymers*, **116**, 34-41.
- Dhibi, M., Issaoui, M., Brahmi, F., Mechri, B., Mnari, A., Cheraif, I., Skhiri, F., Gazzah, N. & Hammami, M. (2014). Nutritional quality of fresh and heated Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oil: trans-fatty acid isomers profiles and antioxidant properties. *Journal of food science and technology*, **51**, 1442-1452.

- Di Donato, P., Poli A., Taurisano V., et Nicolaus B (2015). Polysaccharides Bioactivity and Biotechnology.
- Divekar Varsha, B. & Mohan, K. (2010). Isolation and characterization of mucilage from *Lepidium sativum* Linn. seeds. *Internaional journal of pharma research and development*,**2**, 1-5.
- 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.
- Ebringerová, A. (2005). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In: Macromolecular symposia. Pp. 1-12. Wiley Online Library.
- Ebringerova, A., Kardošová, A., Hromádková, Z. & Hřibálová, V. (2003). Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*,**74**, 52-61.
- Evaristo, I., Batista, D., Correia, I., Correia, P. & Costa, R. (2013). Chemical profiling of Portuguese *Pinus pinea* nuts and comparative analysis with *P. koraiensis* commercial kernels. *Options Méditerranéennes*,**105**, 99-104.
- Faccin-Galhardi, L. C., Yamamoto, K. A., Ray, S., Ray, B., Linhares, R. E. C. & Nozawa, C. (2012). The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. *Journal of ethnopharmacology*,**142**, 86-90.
- Fedail, J. S., Ahmed, A. A., Musa, H. H., Ismail, E., Sifaldin, A. Z. & Musa, T. H. (2016). Gum arabic improves semen quality and oxidative stress capacity in alloxan induced diabetes rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*,**5**, 434-441.
- Gao, J., Zhang, T., Jin, Z.-Y., Xu, X.-M., Wang, J.-H., Zha, X.-Q. & Chen, H.-Q. (2015). Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb. *Food Chemistry*,**169**, 430-438.
- Gaussen, H. (1982). Précis de botanique.
- 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.
- Ghenima, A. I., Idir, M., Nadjjet, M. G., Samia, M. A., Mihoub, Z. M. & Karim, H. (2015). In vitro evaluation of biological activities of *Pistacia lentiscus* aqueous extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*,**7**, 133-139.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*,**125**, 1401-1412.

- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Chea, A. & Topal, F. (2010). Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, **25**, 44-53.
- He, F. (2011). Bradford protein assay. *Bio-protocol*, e45-e45.
- Jani, G. K., Shah, D. P., Prajapati, V. D. & Jain, V. C. (2009). Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian J Pharm Sci*, **4**, 309-323.
- Jaouadi, W., Alsubeie, M., Mechergui, K. & 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.
- Jeddou, K. B., Chaari, F., Maktouf, S., Nouri-Ellouz, O., Helbert, C. B. & Ghorbel, R. E. (2016). Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. *Food Chemistry*, **205**, 97-105.
- Kadri, N., Khettal, B., Aid, Y., Kherfellah, S., Sobhi, W. & 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.
- Karou, D., Dicko, M. H., Simporé, J. & Traore, A. S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African journal of biotechnology*, **4**, 823-828.
- Kim, H., Hong, H.-D. & Shin, K.-S. (2017). Structure elucidation of an immunostimulatory arabinoxylan-type polysaccharide prepared from young barley leaves (*Hordeum vulgare* L.). *Carbohydrate polymers*, **157**, 282-293.
- Kouadri, I. & Satha, H. (2018). Extraction and characterization of cellulose and cellulose nanofibers from *Citrullus colocynthis* seeds. *Industrial Crops and Products*, **124**, 787-796.
- Kouassi, M.-C. (2017). Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés antioxydantes et antibactériennes. Normandie Université.
- Kumar, S., Prasad, A., Iyer, S. & Vaidya, S. (2013). Systematic pharmacognostical, phytochemical and pharmacological review on an ethno medicinal plant, *Basella alba* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, **5**, 53-58.
- Lee, J.-B., Tanikawa, T., Hayashi, K., Asagi, M., Kasahara, Y. & Hayashi, T. (2015). Characterization and biological effects of two polysaccharides isolated from *Acanthopanax sciadophylloides*. *Carbohydrate polymers*, **116**, 159-166.
- Lehout, A. (2008). Limites thermiques et adaptation de Pin Pignon dans la région de Constantine.

- 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.
- Lim, T. (2012). *Pinus pinea*. In: Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. Pp. 304-310. Springer.
- Liu, J., Willför, S. & Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, **5**, 31-61.
- Liu, Y., Fang, S., Zhou, M., Shang, X., Yang, W. & Fu, X. (2018). Geographic variation in water-soluble polysaccharide content and antioxidant activities of *Cyclocarya paliurus* leaves. *Industrial Crops and Products*, **121**, 180-186.
- Loulou, Z. (1978). Analyse des reboisements de Pin pignon dans la région de Mostaganem : Contribution à l'étude dendrométrique. In: Ing.Ins.Agro. Pp. 90. Alger.
- Lutz, M., Álvarez, K. & Loewe, V. (2017). Chemical composition of pine nut (*Pinus pinea* L.) grown in three geographical macrozones in Chile. *CyTA-Journal of Food*, **15**, 284-290.
- Maran, J. P., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Nivetha, C. V. & Dinesh, R. (2013). Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate polymers*, **92**, 604-611.
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, **20**, 458-463.
- Messai, N., Berchi, S., Boulknafe, F. & Louadi, K. (2010). Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Entomologie faunistique-Faunistic entomology*.
- Mirov, N. T. (1967). The genus *Pinus*. *The genus Pinus*.
- Mkedder, I. (2012). Modification et dégradation enzymatique de polysaccharides: investigation par imagerie et diffusion de rayonnement. Grenoble.
- Morris, D. L. (1948). Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science (Washington)*, **107**, 254-255.
- Moualek, I., Aiche, G. I., Guechaoui, N. M., Lahcene, S. & Houali, K. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, **6**, 937-944.
- Nakhoul, J. (2020). Dynamique et facteurs influençant la régénération naturelle de *Pinus pinea* L. au Mont Liban. Aix-Marseille Université.

- Ndiaye, M., Sy, G., Dièye, A., Touré, M. & Faye, B. (2006). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'annona reticulata (annonaceae) sur l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, **14**, 179-186.
- Nergiz, C. & Dönmez, I. (2004). Chemical composition and nutritive value of Pinus pinea L. seeds. *Food Chemistry*, **86**, 365-368.
- Nie, C., Zhu, P., Ma, S., Wang, M. & Hu, Y. (2018). Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce. *Carbohydrate polymers*, **188**, 236-242.
- 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.
- Ozenda, P. (1991). Les relations biogéographiques des montagnes sahariennes avec la région méditerranéenne. *Revue de géographie alpine*, **79**, 43-53.
- Petera, B., Delattre, C., Pierre, G., Wadouachi, A., Elboutachfati, R., Engel, E., Poughon, L., Michaud, P. & Fenoradosoa, T. A. (2015). Characterization of arabinogalactan-rich mucilage from Cereus triangularis cladodes. *Carbohydrate polymers*, **127**, 372-380.
- Premanathan, M., Arakaki, R., Izumi, H., Kathiresan, K., Nakano, M., Yamamoto, N. & Nakashima, H. (1999). Antiviral properties of a mangrove plant, Rhizophora apiculata Blume, against human immunodeficiency virus. *Antiviral Research*, **44**, 113-122.
- Price, R. A. (1989). The genera of Pinaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, **70**, 247-305.
- Rasolohery, C. A. (2007). Étude des variations de la teneur en isoflavones et de leur composition dans le germe et le cotylédon de la graine de soja [Glycine max (L.) Merrill].
- 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.
- 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.
- Sánchez, M. P. (2006). Polysaccharides ayant une activité immunomodulatrice chez les champignons indigènes du Québec.
- Sbay, H. & Abourouh, M. (2006). Apport des espèces à usages multiples pour le développement durable: cas du pin pignon et du caroubier. *Centre de Recherche Forestière Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification, Rabat*, 1-9.

- Schmitt, J. & Flemming, H.-C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **41**, 1-11.
- Sharifian-Nejad, M. S. & Shekarchizadeh, H. (2019). Physicochemical and functional properties of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) polysaccharides extracted under optimal conditions. *International journal of biological macromolecules*, **124**, 946-954.
- Sharma, V. & Singh, M. (2013). In vitro antiarthritic and hemolysis preventive: membrane stabilizing efficacy of ethanolic root extract of *Operculina turpethum*. *WJPPS*, **2**, 302-312.
- Shi, J.-J., Zhang, J.-G., Sun, Y.-H., Qu, J., Li, L., Prasad, C. & Wei, Z.-J. (2016). Physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides sequentially extracted from peony seed dreg. *International journal of biological macromolecules*, **91**, 23-30.
- Singdevsachan, S. K., Auroshree, P., Mishra, J., Baliyarsingh, B., Tayung, K. & Thatoi, H. (2016). Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, **7**, 1-14.
- Srivastava, R. & Kulshreshtha, D. K. (1989). Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochemistry*, **28**, 2877-2883.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O. & Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, **113**, 1226-1233.
- Taflin, C., Nochy, D., Hill, G., Frouget, T., Rioux, N., Vérine, J., Bruneval, P. & Glotz, D. (2010). Regulatory T cells in kidney allograft infiltrates correlate with initial inflammation and graft function. *Transplantation*, **89**, 194-199.
- Touaba, C. & Alatou, D. (2017). Adaptation des semis de Pin pignon (*Pinus pinea* L.) au stress combiné hydrique et thermique par des marqueurs biochimiques. *Journal of Applied Biosciences*, **114**, 11393-11403.
- Umapathy, E., Ndebia, E., Meeme, A., Adam, B., Menziwa, P., Nkeh-Chungag, B. & Iputo, J. (2010). An experimental evaluation of *Albica setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *Journal of Medicinal Plants Research*, **4**, 789-795.
- Wang, L., Zhang, B., Xiao, J., Huang, Q., Li, C. & Fu, X. (2018). Physicochemical, functional, and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit. *Food Chemistry*, **249**, 127-135.
- Wu, A. M., Rihouey, C., Seveno, M., Hörnblad, E., Singh, S. K., Matsunaga, T., Ishii, T., Lerouge, P. & Marchant, A. (2009). The Arabidopsis IRX10 and IRX10-LIKE glycosyltransferases

- are critical for glucuronoxylan biosynthesis during secondary cell wall formation. *The Plant Journal*, **57**, 718-731.
- Wu, D.-T., Liu, W., Han, Q.-H., Wang, P., Xiang, X.-R., Ding, Y., Zhao, L., Zhang, Q., Li, S.-Q. & Qin, W. (2019). Extraction optimization, structural characterization, and antioxidant activities of polysaccharides from Cassia Seed (*Cassia obtusifolia*). *Molecules*, **24**, 2817.
- Xu, R.-B., Yang, X., Wang, J., Zhao, H.-T., Lu, W.-H., Cui, J., Cheng, C.-L., Zou, P., Huang, W.-W., Wang, P., Li, W.-J. & Hu, X.-L. (2012). Chemical Composition and Antioxidant Activities of Three Polysaccharide Fractions from Pine Cones. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 14262-14277.
- Yang, C.-H., Li, R.-X. & Chuang, L.-Y. (2012). Antioxidant activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods. *Molecules*, **17**, 7294-7304.
- Yang, L. & Zhang, L.-M. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate polymers*, **76**, 349-361.
- Yemm, E. & Willis, A. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal*, **57**, 508-514.
- Yoo, S.-H. & Chang, Y. H. (2017). Effects of extraction methods on in vitro biological capacities and rheological properties of polysaccharides from red pepper stems. *Preventive nutrition and food science*, **22**, 223.
- Zhang, H., Zhao, H., Yao, L., Yang, X., Shen, S., Wang, J., Wang, Z., Regenstein, J. M. & Geng, L. (2017). Isolation, physicochemical properties, and in vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from different parts of *Pinus koraiensis*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **37**, 225-240.
- Zhang, Y. (2012). Etude des relations entre structures et propriétés de films d'arabinoxylanes isolés de co-produits agricoles. Reims.
- Zhu, D.-Y., Ma, Y.-L., Wang, C.-H., Wang, H., Ren, Y.-F., Zhang, J.-G., Thakur, K. & Wei, Z.-J. (2017). Insights into physicochemical and functional properties of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.). *International journal of biological macromolecules*, **105**, 1192-1201.
- ZOBIRI, O. & HAMAITI, M. (2019). Contribution à l'étude de l'activité anti-inflammatoire des polysaccharides hydrosolubles d'*Astragalus gombo* chez les rats Wistar albinos. Université d'El Oued.

Annexes

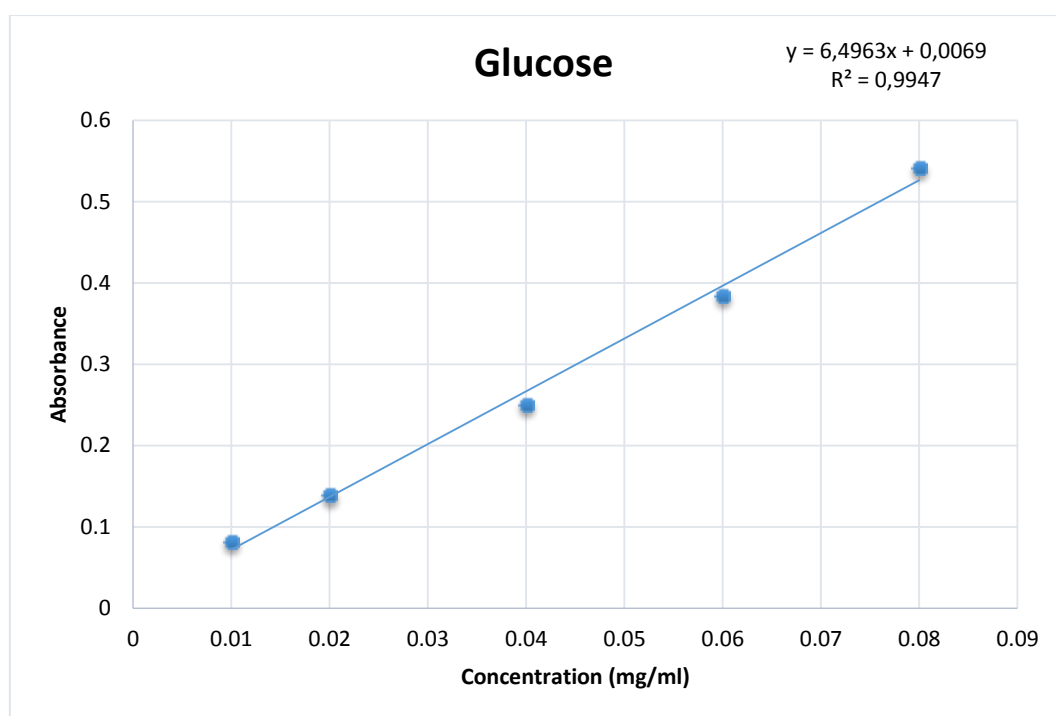
Annexe N°1

Figure 01 : Courbe d'étalonnage de glucose utilisé pour le dosage des sucres totaux.

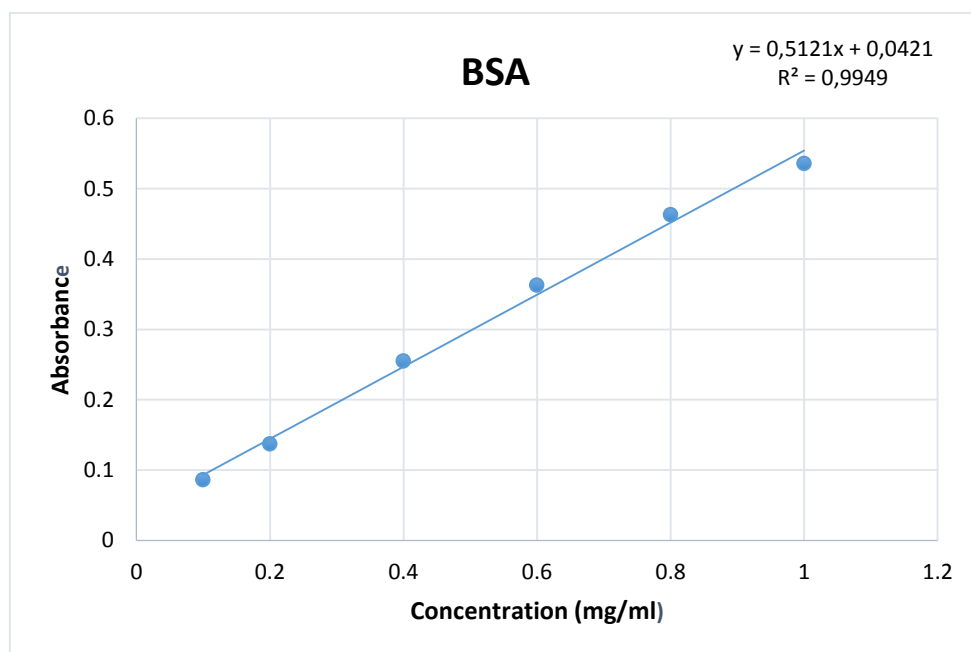
Annexe N°2

Figure 02 : Courbe d'étalonnage de BSA utilisé pour le dosage de protéines totales.

Annexe N°3

Préparation des solutions de travail :

- Solution de PBS : Préparée en mélangeant progressivement 20 mg de KCl, 0,144 g de NaH_2PO_4 avec 24 mg KH_2PO_4 et NaCl dans 100 ml de H_2O , agitation jusqu'à la solubilisation puis on ajuste le PH jusqu'à l'obtention d'un pH 7,4.

- 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), 0,5 % de NaCl (0,5 g de NaCl dans 100 ml de PBS).

Résumé

Dans le présent travail, la teneur totale en polysaccharides et en protéines, l'activité antioxydante et anti-hémolytique et les propriétés fonctionnelles des extraits de polysaccharides des graines de *Pinus pinea* L. ont été étudiées. L'étude note un rendement d'extraction de $1,8 \pm 0,122$ % et $2,06 \pm 0,735$ % pour les extraits polysaccharidique déprotéinisé et non déprotéinisé, respectivement. La teneur totale en sucre des extraits polysaccharidiques déprotéinisé et non déprotéinisé était de $77,529 \pm 1,109$ % et $46,929 \pm 0,217$ %, respectivement, tandis que leur teneur en protéines était de $6,404 \pm 0,276$ % et $33,762 \pm 1,518$ %, respectivement. L'extrait polysaccharidique étudié a montré de bonnes propriétés fonctionnelles, il a une bonne solubilité dans l'eau, une bonne capacité de rétention d'huile et des capacités moussantes et émulsifiantes. L'activité antioxydante évaluée par le test anti-radicalaire ABTS a indiqué que l'extrait a un pourcentage d'inhibition de $19,568 \pm 0,451$ % et une valeur DO de $0,3925 \pm 0,004$ pour le test de pouvoir réducteur FRAP, ce qui implique la faible activité de l'extrait et son inefficacité. Les tests d'inhibition de l'hémolyse osmotique et de l'hémolyse induite par la chaleur ont révélé que l'extrait de polysaccharide a une bonne activité anti-hémolytique.

Mots clés: polysaccharides, *Pinus pinea*L., activité antioxydante, activité anti-hémolytique, propriétés fonctionnelle.

Abstract

In the present work, the total polysaccharide and protein content, antioxidant and anti-hemolytic activity and functional properties of the polysaccharide extracts of *Pinus pinea* L. seeds were studied. The study notes an extraction yield of $1.8 \pm 0.122\%$ and $2.06 \pm 0.735\%$ for the deproteinized and non-deproteinized polysaccharide extracts, respectively. The total sugar content of the deproteinized and non-deproteinized polysaccharide extracts was $77.529 \pm 1.109\%$ and $46.929 \pm 0.217\%$, respectively, while their protein content was $6.404 \pm 0.276\%$ and $33.762 \pm 1.518\%$, respectively. The studied polysaccharide extract showed good functional properties, it has good water solubility, good oil retention capacity and foaming and emulsifying capacities. Antioxidant activity evaluated by ABTS anti-radical assay indicated that the extract has a percentage inhibition of $19.568 \pm 0.451\%$ and an OD value of 0.3925 ± 0.004 for FRAP reducing power assay, implying the low activity of the extract and its inefficiency. The osmotic hemolysis and heat-induced hemolysis inhibition tests revealed that the polysaccharide extract has good anti-hemolytic activity.

Key words: polysaccharides, *Pinus pinea*L., antioxidant activity, anti-hemolytic activity, functional properties

المخلص

لقد درسنا في عملنا محتوى السكريات الكلية، والنشاط المضاد للأكسدة، ومضادات الانحلال الدموي، والخصائص الوظيفية لمستخلصات السكريات للنبات: الصنوبر (*Pinus pinea* L). تشير الدراسة إلى عائد جماعي لاستخراج 1.8% و 2.06% للسكريات منزوعة البروتين وغير منزوعة البروتين على التوالي ويسجل أيضاً أن تكوين السكريات المعزولة هو 33.762% ؛ 46.929% في البروتينات والسكريات الكلية لمستخلص عديد السكاريد غير منزوع البروتين على التوالي ومستخلص عديد السكاريد منزوع البروتين بنسبة 77.529% للسكريات الكلية و 6.404% للبروتينات. هذه السكريات لها العديد من الخصائص الوظيفية: فهي قابلة للذوبان، ولها قدرة جيدة على الاحتفاظ بالزيت ولها قوة رغوة واستحلاب. يتم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبار ABTS المضاد للجذور والذي يشير إلى أن الجزء الذي تم الحصول عليه له نسبة تثبيط بنسبة 19.568% وقيمة OD هي 0.3925 مع اختبار القدرة المختزلة FRAP وبالتالي فإن هذا النشاط ضعيف وغير فعال. كشف الإجهاد التناضحي واختبار تثبيط انحلال الدم الناجم عن الإجهاد الحراري أن هذه السكريات لها نشاط جيد مضاد للانحلال.

الكلمات المفتاحية: السكريات المتعددة، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد الانحلال الدموي، خاصية وظيفية، *Pinus pinea* L.