

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



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

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

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

SLIMANI Cilia & DERBAL LAIDLI Ahlem

Thème

*Evaluation de quelques activités biologiques des extraits
polysaccharidiques des graines de Pinus halepensis Mill.*

Soutenu le : 28 / 06 / 2018 à 14 h

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. REMINI Hocine</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Mlle. ABOU Amina</i>	<i>Doctorante</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Co-Promotrice</i>
<i>Mme. MEDBOUA Chafiaa</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciement

On tient avant à remercier dieu tout puissant de nous avoir donné la force et la volonté pour achever ce modeste travail.

A Mr kadri nabil

On voudrait adresser toute nos reconnaissances à notre cher encadreur, merci de nous avoir fait bénéficier de votre pédagogie, votre écoute, votre ouverture d'esprit, malgré vos emplois du temps surchargé. Votre vision de la recherche scientifique, est très importante pour nous et vos connaissances ont largement contribué à l'évolution de la présente étude. Merci de nous avoir enseigné la pratique des sciences et la rigueur de la démarche expérimentale, de nous avoir transmis votre capacité d'enthousiasme et votre force, merci de nous avoir offert cette grande liberté de travail de nous avoir appris comment compter sur soi et prendre des bonnes décisions. On a énormément appris auprès de vous et on gardera longtemps le souvenir de vos enseignements et de vos qualités humain.

A Mlle Abbou Amina

*Votre amour pour la science, exercer à vos cotes ne peut qu'enrichi, nos connaissance, on ne saurait qualifier l'immense soutien, les conseils et les précieuses directives, que vous nous avez prodiguée au cours de cette étude
On vous en serait reconnaissant toute notre vie et on vous souhaite une bonne continuation.*

A Mr Saadi sidahmed et Mr Sabaou

On vous remercie vivement pour votre soutien qui nous a faciliter les tâches et de nous avoir accueilli dans votre Laboratoire. On vous remercie pour votre disponibilité et vos conseils.

Nos remerciements s'adressent également à tous les ingénieurs des laboratoires de l'université de bouira, un grand merci pour leurs aides et leurs patiences avec nous, merci à toute l'équipe du laboratoire d'analyse d'Hôpital Mchedallah.

On remercie Mr Remini d'avoir accepté a présider notre soutenance et Mme Medboua pour l'évaluation de notre travail, en profitant à vous remercier pour votre soutien, serviabilité, modestie et gentillesse avec nous tout au long notre cursus.

On remercié tout les enseignants (es) de la faculté SNV à leur tête : Mme Medboua ,Mr Tighilet ,Mr Adrar et Mr Remini et Mr Chergui.

Enfin, on adresse nos plus sincères remerciements à nos proches et amis (es), y compris Mlle Mammeri, Mlle Salemi .

Je dédie ce mémoire à ...

A la mémoire de mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi mon cher papa .Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être .Ce travail était ton souhait et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation .Mes fortes pensées pour toi mon très cher père , mon exemple

Que DIEU t'accueille dans son vaste paradis.

A ma très chère MAMAN

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études ,tu as joué le double rôle d'un papa et d'une maman. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorde santé, longue vie et bonheur. Sans oublier ma chère NANA qui est pour moi une deuxième mère que j'apprécie énormément et qui est présente toujours là avec ses prières. Je te souhaite NANA tout le bonheur de la vie et que DIEU te garde et te bénisse.

A mes très chers frères Naim , Rachid et Mourad

A ma très chère sœur et mes chères belles sœurs

A mes petits neveux et nièces

A toutes mes amies , Soriya ,Amel ,Imen et Nouna

A mon binôme Ahlem

A toutes personnes qui m'a aidé de près ou de loin.

CYCY

Dédicaces

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur que je dédie du fond du cœur à ceux que j'aime et que je remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant toute mon existence.

À mes parents en signe de reconnaissance pour tout ce qu'ils ont consenti d'effort rien que pour me voir réussir, Et voilà, l'occasion est venue avec ce travail.

À mes frères Halim , Aziz et la lumière de mon chemin Anis.

À ma chère sœur Tilelli.

À mon mari MOKRANE, modèle de sacrifice, d'amour et de générosité, la source de mon inspiration, ton encouragement et ton soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance. Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, par ton amour dévoué et ta tendresse, pour donner du goût et du sens à notre vie de famille. En témoignage de mon amour, de mon admiration et de ma grande affection, je te prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon sincère attachement. Je prie dieu le tout puissant pour qu'il te donne bonheur et prospérité.

À Mon Très Cher Petit Poussin ILYANE : C'est à toi mon adorable ange, majoie, mon petit trésor que mamandédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie. Je t'aime mon bébé et je te souhaite tous le bonheur du monde.

À mes beaux-parents à qui je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous comble de santé, de bonheur et vous procure une longue vie.

À mes beaux-frères Islem, Mostapha et ma belle-sœur Asma.

À ma chère amie, soeur, Sylia, binôme que j'aime, qui m'a supporté durant ces trois dernières années et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais toujours besoin, et qui était vraiment tolérante.

À mes amies : Amal, Imene, Nouna, Soraya, Hayet, Lilya, Mamal, Meriam, Salwa, Dehia, Sylia, Zineb.

Et toute la famille DERBAL et LAIDLI.

Sommaire

Introduction	1
I- Synthèse bibliographique	
I- Généralité sur <i>Pinushalepensis</i> Mill	3
I.1.1. Taxonomie	3
I.1.2. Répartition du pin d'Alep	
I.1.2.1. dans le monde	4
I.1.2.2. en Algerie	4
I.1.3. Caractères botanique du <i>pinushalepensis</i>	5
I.1.4. Exigence climatiques	5
I.1.5. La régénération du pin d'Alep	5
I.1.6. La composition chimique	6
I.1.7. Les propriétés biologiques du genre pinus	6
II-2- Généralité sur les polysaccharides	8
II.1.1. Classification et nomenclature des polysaccharides	8
II.1.2. Les sources des polysaccharides	
II.1.3. Les applications des polysaccharides en médecine	10
II.1.4. Les activité biologique des polysaccharides	11
II.1.4.1. Activité anti diabétique	11
II.1.4.2. Activité anti-oxydante	11
II.1.4.3. Activité hépato protection	11
II.1.4.4. Activité anticancéreuse	12
II.1.4.5. Activité anticoagulante	12
II.1.4.6. Activité antiviral	13
III-Matériel et Méthodes	14
III.1. Matériel	14
III.1.1. Matériel végétal	15
III.1.2. Matériel instrumental et réactifs chimiques	15
III.2. Méthodes	15
III.2.1. Extraction des polyccharides	16
III.2.1.1. Extraction enzymatique	17
III.2.1.2. Extraction par l'eau chaude	19
III.2.2. Activités biologiques	19
III.2.2.1. L'activités anti hémolytique sur les cellules sanguine humaine	20
III.2.2.2. Etude de l'activité anti-oxydante	20
III.2.2.3. Etudes de l'activité anti –microbienne	24
VI- Résultats et discussions	25
IV.1. Rendement d'extraction	25
IV.2. Evaluation de l'activité anti oxydante et anti hémolytique	25
IV.2.1. Inhibition du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	25
IV.2.2. Activité anti hémolytique	27
IV.3. Activité anti microbienne	29
Conclusion	31

Sommaire

Liste des abréviations

PBS : Phosphate buffered saline ;

MH : Mueller Hinton ;

PDA: Potato dextrose agar;

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ;

Nacl : Chlorure de sodium ;

LDL-cholestérol : Low density lipoprotein;

HDL-cholestérol : High density lipoprotein;

ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène ;

RMN : Résonance magnétique nucléaire ;

IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Sommaire

Numéro de la figure	Titre	Page
01	<i>Pinus halepensis. Mill</i>	3
02	<i>Pinus halepensis. Mill</i>	3
03	Répartition du pin d'Alep en région méditerranéenne	4
04	La répartition du pin d'Alep en Algérie	5
05	La structure du chitosane	9
06	La structure du dextrane	10
07	Carte géographique de la wilaya de Bouira	14
08	Les différentes étapes d'extraction enzymatique	16
09	Les différentes étapes d'extraction par l'eau chaude	18
10	Structure du radical DPPH [·] et DPPH réduit	19
11	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH	25
12	Pourcentage d'inhibition d'hémolyse	27
13	Aspect du sang avant(A) et après (B) traitement par les polysaccharides des gaines de <i>Pinus halepensis</i> Mill	27

Sommaire

SOMMAIR DES tableaux

Numéro de tableau	Titre	Page
1	Systematiques de <i>pinushalepensis</i>	4
2	Matériel instrumental et réactifs chimiques	18
3	Matériels utilisés pour l'activité anti hémolytique sur les cellules sanguine humaine	23
4	Matériels utilisés pour l'activité anti hémolytique sur les cellules sanguine humaine	25
5	Matériels et réactifs utilisés pour l'activité anti-microbienne	26

Sommaire

Numéro de tableau	Titre	Page
I	Systematique du <i>pinus halepensis</i>	04
II	Matériel instrumental et réactif chimique	15
III	Rendement d'extraction des polysaccharides	22
IV	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) obtenu pour les souches.	26

Introduction

Les plantes ont formé la base des systèmes sophistiqués de la médecine traditionnelle, elles existent depuis des milliers d'années et continuent d'apporter à l'humanité de nouveaux remèdes. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80 % des habitants de la planète continuent à s'appuyer principalement sur le système de médecine traditionnelle pour leurs soins de santé. Les produits végétaux jouent également un rôle important dans le système de soins de santé pour les 20 % restants de la population. Sur les 119 composés chimiques purs extraits de plantes supérieures utilisées en médecine à travers le monde, 74% de ces composés ont la même utilisation que les plantes à partir desquelles sont dérivées (**Gurib-Fakim 2006**).

Les composés bioactifs végétaux les plus utilisés et les plus répandus sont des métabolites appelés secondaires (composés phénoliques, terpènes et alcaloïdes) admis à aider les plantes à augmenter leur capacité globale de survie, ils présentent des effets pharmacologiques ou toxicologiques chez les êtres humains et les animaux (**Azmir, Zaidul et al. 2013**). Quoique, ces plantes sont aussi riches en composés appelés métabolites primaires tels que les glucides, les acides aminés, les protéines et les lipides. Ces substances chimiques destinées à la croissance et au développement des végétaux sont tout aussi actifs et puissants que les métabolites secondaires.

Tout au long des deux dernières décennies, les chercheurs ont suggéré l'importance des glucides et prévu pour eux de nombreuses applications notamment dans le secteur biomédical en raison de leur large spectre de propriétés thérapeutiques, de leur abondance et de leurs sources renouvelables non toxiques et biodégradables (**Renaud, Belgacem et al. 2005**).

L'analyse de la littérature met en lumière des polysaccharides extraits de différentes familles de plantes médicinales comme des composés multifonctionnels (**Deters, Lengsfeld et al. 2005**) avec plusieurs activités biologiques, à savoir l'activité antitumorale (**LIU et al., 2007**), anti oxydante pour la famille des Tremellaceae (*Tremellamesenterica*), (**Yan, Yu et al. 2011**), antivirale pour les ulvaceae (*Ulvaclathrata*) (**Aguilar-Briseno, Cruz-Suarez et al. 2015**), anticoagulante et anti compléments pour les Geoffroaceae (*Geoffroaspinoso*)

(Souza, Assreuy et al. 2015) et hépato-protectrice pour les Orobanchaceae (*Boschniakiarossica*) (Quan, Li et al. May 2013).

Néanmoins, très peu de travaux sont réalisés sur l'utilisation de l'extrait polysaccharidique brut de la famille des Pinaceae spécialement les graines de *Pinus halepensis* Mill. contrairement aux autres fractions de la même famille telle que les polyphénols et les flavonoïdes.

L'objectif de cette étude est d'évaluer quelques activités biologiques des polysaccharides des graines de pin d'Alep récupéré par différents protocoles. Pour cela, le travail est divisé en deux parties distinctes :

➤ une partie bibliographique qui expose dans un premier lieu la description de la matrice végétale étudiée *Pinus halepensis* Mill. En deuxième lieu, la classification l'utilisation et les différentes activités biologiques des polysaccharides.

➤ La deuxième partie est consacrée pour un travail expérimental où nous avons réalisé une extraction des polysaccharides des graines de *Pinus halepensis* Mill. par deux méthodes : une méthode enzymatique et une méthode par l'eau chaude avec lesquelles trois activités biologiques ont été évaluées :

- ✓ L'activité anti-hémolytique
- ✓ L'activité anti-oxydante par la mesure du pouvoir anti-radicalaire par le DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)
- ✓ L'activité anti-microbienne.

I.1. Généralités sur *Pinus halepensis* Mill.

Pinus halepensis Mill est le nom scientifique donné par Philip Miller en 1768 au pin d'Alep (Nahal, 1962). C'est une espèce forestière rustique très présente dans la plupart des variantes bioclimatiques du bassin méditerranéen (Nahal, 1962; Parde, 1957). Son amplitude écologique est très vaste et occupent près de 6,8 millions d'hectares sur l'ensemble du bassin méditerranéen (Newton et al., 2002). C'est un arbre long qui atteint 6 à 20 m de hauteur, appartenant à la famille des *Pinacées* (Kadri et al., 2014).



Figure 01. *Pinus halepensis* Mill.

I.1.1 Taxonomie

Tableau I. systématique de *Pinus halepensis* Mill. (Kadri et al., 2014).

Classification	Espèces
Règne	Plantae
Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Gymnospermes
Ordre	Pinales
Famille	Pinaceae
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i><u>halepensis</u></i>

I.1.2. Répartition géographique du pin d'Alep

I.1.2.1. Dans le monde

Pinus halepensis se trouve à l'état spontané autour du bassin méditerranéen sauf en Egypte. Il est très répandu en Afrique du Nord surtout en Algérie et Tunisie. Ses forêts occupent plus de 2,5 millions d'hectares (Sghaier and Ammari, 2012). En Espagne, il constitue 15 % de la superficie boisée. En Italie, il couvre 20 000 ha et reste à proximité des côtes (BADOT and GARREC, 1993).

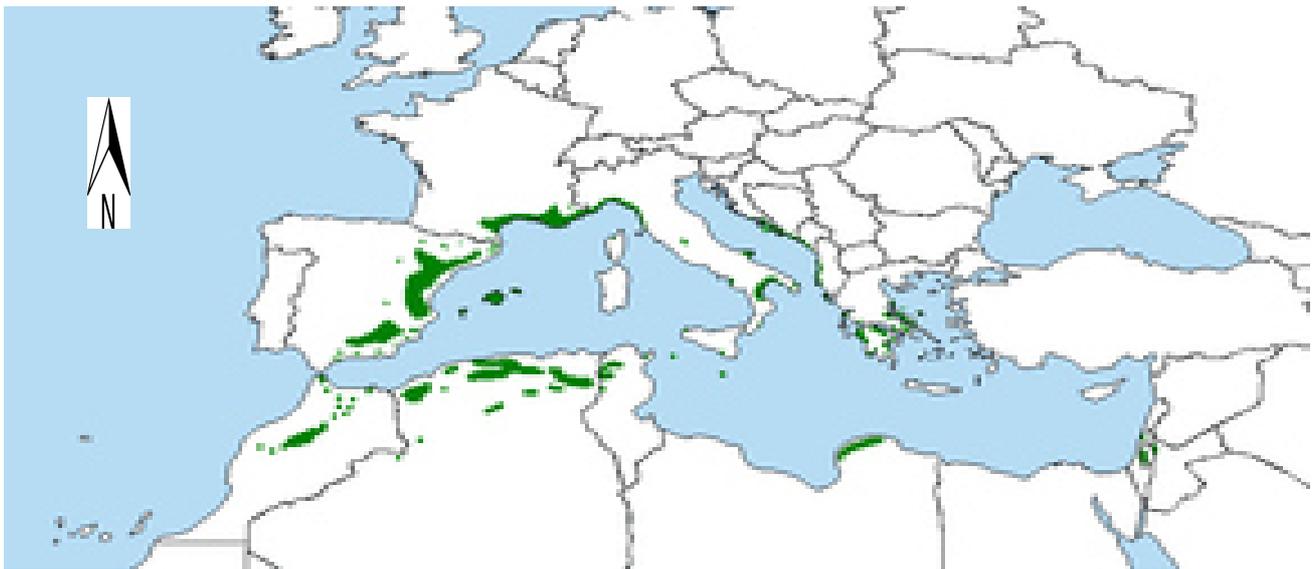


Figure 02. Répartition du pin d'Alep en région méditerranéenne (Fady et al., 2003)

I.1.2.2. En Algérie

En Algérie, il se répartit sur 900 000 ha (Kadri et al., 2015), il occupe 35 % de la surface boisée. Il forme des peuplements dans la région de Tébessa, les plateaux constantinois et les Aurès, la région d'Alger (forêt de média), Sidi bel Abbas, dans l'atlas saharien et dans les forêts du Djurdjura (BARITEAU, 2005; Husen and Pal, 2003).

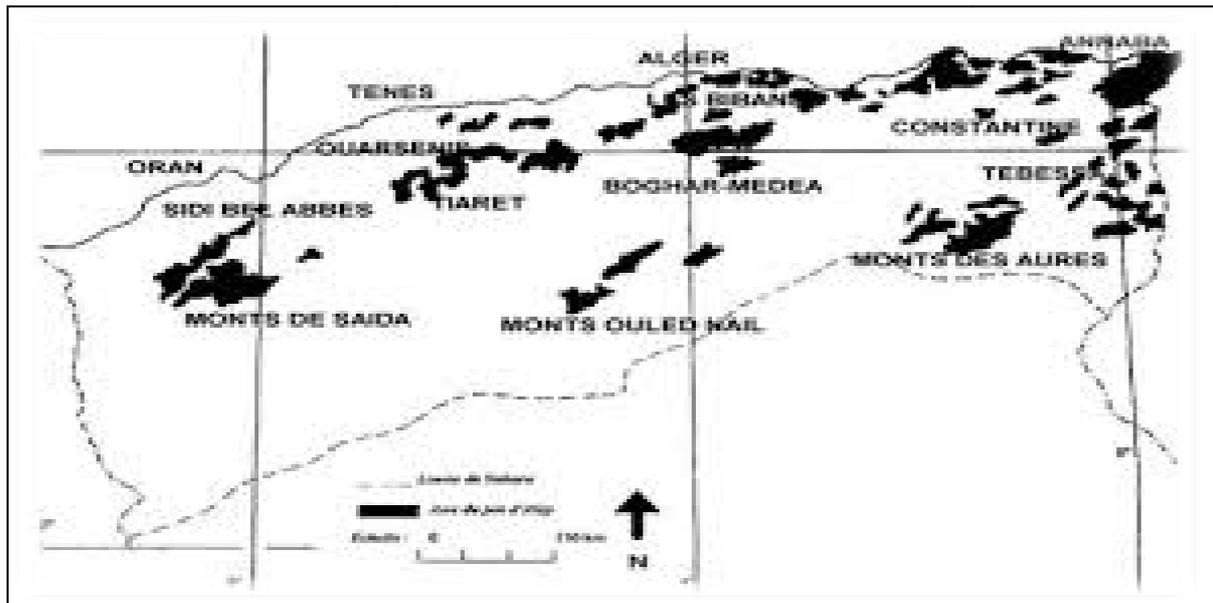


Figure 03. Répartition du pin d'Alep en Algérie

I.1.3. Caractères botanique du *Pinus halepensis* Mill.

Pinus halepensis Mill. est un arbre vert, à écorce d'abord lisse et grise puis épaisse et crevassée tournant en rouge-brun avec l'âge (Debazac and Tomassone, 1965). Les feuilles sont des aiguilles réunies par 2 dans chaque gaine de 5-10 cm de longueur. Les cônes sont oblongs-coniques aigus, longs (8-12 cm), rouge-bruns, à pédoncule très épais constamment réfléchis dont les écailles sont à écusson presque plane et faiblement carénée. Leurs graines, qui sont l'organe de reproduction, sont ovoïdes, bombées à trois angles d'environ 0,6 cm de long, de couleur grise appelées "Zkoukou" dans les régions d'Afrique du Nord (Kadri et al., 2014).

I.1.4. Exigence climatiques

Le pin d'Alep se rencontre dans les étages bioclimatiques méditerranéens ; arides supérieur, semi-arides, sub-arides et humide. C'est une espèce héliophiles et xérophile (Ayari et al., 2014).

I.1.5. Régénération du pin d'Alep

La colonisation du pin d'Alep est limitée par la distance assez faible de dissémination des graines, seulement 3% des graines tombent à plus de 24 m du semencier.

Les graines germent rapidement et en masse à la lumière pendant la saison humide. La mortalité est forte chez les jeunes semis notamment au cours des deux premières années,

mais la grande production de semences et leur taux de germination élevé permettent de compenser ces pertes (**Acherar et al., 1984; Daskalakou and Thanos, 1996**).

Le pin d'Alep possède une banque de graines aériennes constituée par certains cônes sérotineux qui ne s'ouvrent que lorsqu'ils sont soumis à de très fortes températures (**Acherar et al., 1984**). Le feu provoque l'éclatement de ces cônes et favorise la dispersion des graines grâce au déplacement turbulent de masses d'air chaud qui peut transporter les graines sur des distances importantes (**Acherar et al., 1984**).

Les graines de pin d'Alep peuvent supporter des températures comprises entre 130 et 150 °C (**Ayari et al., 2014**).

I.1.6. Composition chimique

Les graines du *Pinus halepensis* Mill. se composent d'environ 22,7 % de protéines, 43,3 % d'huile, 8,3 % de cendre, 1 % de Potassium, Magnésium et Calcium et 5,7 % de carbohydrates totaux (**Kadri et al., 2015**).

Les huiles essentielles des racines de *Pinus halepensis* Mill. sont caractérisées par la prédominance des monoterpènes hydrocarbonés avec 93,2 % et il est à noter que l' α -Pinène est le constituant monoterpénique majoritaire avec un pourcentage de (87,4%). Suivis des sesquiterpènes hydrocarbonés avec 5,5% (**SELADJI, 2014**).

I.1.7. Propriétés biologiques du genre Pinus

Selon **Kadri et al. (2014)**, les propriétés bénéfiques de ce genre en général se ramènent principalement aux propriétés pharmacologiques de leurs composés par leurs activités anti-inflammatoires, antioxydants, antinéoplasiques et immunomodulatrices.

Les graines de cet arbre peuvent être un remède naturel pour plusieurs maladies incluant un effet sur la fatigue et le vieillissement (**Kadri et al., 2014**).

Kadri et al. (2014), ont montré que les lipides neutres, glycolipides et les phospholipides des graines de *P. halepensis* Mill. ont une forte activité anti-Angiogénique.

Pasqualini et al. (2003) ont confirmé l'intérêt des composés phénoliques des écailles de *Pinus halepensis* Mill. comme indicateur biologique de la qualité de l'air.

La composition chimique de l'essence de térébenthine de *Pinus halepensis* Mill. a montré une bonne activité antibactérienne et anti fongique (**Ghanmi et al., 2007**).

L'activité anti-oxydante *in vivo* des polyphénols des graines de *Pinus koraiensis* a également été étudiée et a montré que l'extrait peut inhiber fortement le vieillissement des souris en renforçant l'activité de la superoxydedismutase, en diminuant le malondialdéhyde contenu et en augmentant le contenu en glutathion. Il a aussi été constaté que l'extrait peut inhiber puissamment les dommages oxydant induits par les rayons (**Kadri et al., 2014**).

Il a été démontré aussi que les graines de pin ont un effet sur la régulation du cancer lié aux protéines, Ces actions pharmacologiques attribuées aux graines de pin sont liées à la présence à la fois des substances bioactives lipophiles et hydrophiles : les terpènes, les acides gras et triacylglycérides, les vitamines, les polyphénols, les acides aminés et les macro/oligoéléments (**Kadri et al., 2014**).

Les huiles essentielles de *Pinus halepensis* Mill. peuvent être utilisées comme additifs alternatifs dans la nourriture, la pharmacutique et dans la préparation des produits cosmétiques. Ils ont aussi signalé une forte activité anti oxydante (**Djerrad et al., 2015**).

L'huile de pin fournit un moyen naturel pour diminuer la sensation de faim, ceci conduit à une réduction de la consommation calorique et à l'absorption de graisses (**Hughes et al., 2008; Pasman et al., 2008**). Donc elle peut être prescrite pour les personnes obèses sans crainte des effets secondaires rencontrés avec la prise des produits chimiques.

II.1. Généralités sur les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères d'origine naturelle constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons osidiques. Ils sont des enchainements covalents de 20 à plusieurs milliers d'unités mono saccharidiques (**Dhahri, 2017**). Il existe dans la nature de nombreuses variétés de polysaccharides qui peuvent être d'origine végétale (amidon, cellulose, pectines, alginates ou l'agar), animale (héparine) ou microbienne (dextrans, xanthanes) (**Joseph et al., 2013**).

Les polysaccharides sont stables, non toxiques, biodégradables, biocompatibles et hydrosolubles. Ils existent sous de nombreuses formes et ont des propriétés qui les rendent extrêmement adaptés aux applications biomédicales, pharmaceutiques et cosmétiques. Une large gamme de polysaccharides sont déjà utilisés dans des applications médicales et alimentaires tels que la cellulose, l'héparines, l'amidon et la pectine (**Persina et al., 2011**).

II.1.1. Classification et nomenclature des polysaccharides

Les polysaccharides peuvent être classés selon leur structure, leur composition chimique, leur solubilité, leur source et leurs applications.

Selon leur composition chimiques, ils sont classés en deux types : Les homopolysaccharides (homoglycanes) qui sont constitués d'un seul type de monosaccharides comme la cellulose et le glycogène qui ne sont constitués que de glucose, et les hétéropolysaccharides (hétéroglycanes) qui sont constitués de monosaccharides différents tel que l'héparine qui est constitués d'acide α -1-idopyranosyluronic 2-sulfate et 2-désoxy-2-sulfoamino- α -d-glucopyranose 6-sulfate (**Xiao et al., 2011**). D'après la nature des molécules liées au glycanes, les polysaccharides peuvent également être des glycoprotéines ou des glycolipides (**Liun et al., 2015**).

Le polysaccharide est le nom donné à une macromolécule composée d'un grand nombre de monosaccharides. Les résidus sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ils peuvent être linéaires, embranchés ou à répétition. Leur nomenclature suit les principes généraux des produits organiques stables et la nomenclature des carbohydrates (**IUPAC-IUBMB, 1997**).

II.1.2. Les sources des polysaccharides

- **Source animale**

Les polysaccharides animaux appartiennent à la famille des glycosaminoglycan (GAG) et sont issus des protéoglycanes (**Liun et al., 2015**). Ces polymères sont soit impliqués dans la structure des tissus conjonctifs (dermatanes sulfates et chondroitines), soit dans la communication cellulaire via leurs propriétés fonctionnelles (héparines et héparane sulfate) (**Boual 2014**).

Ces polymères sont constitués de résidus neutres (glycosamine) et acide glucuronique plus au moins sulfaté. L'héparine est un polymère fortement lié aux protéines, il s'agit d'une molécule à activité anticoagulante immédiate utilisée dans le traitement curatif et préventif des maladies thromboembolique (**Boual 2014**). Le chitosane est trouvé dans les exosquelettes des arthropodes (**Francis Suh.J.-K and Matthew, 2000**).

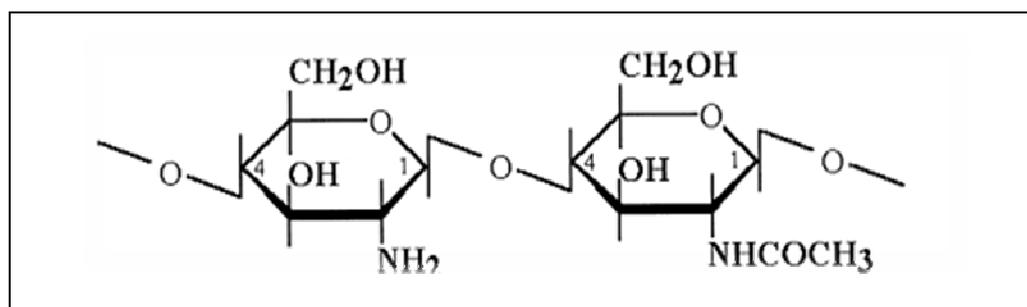


Figure 04. Structure du chitosane (**Francis Suh.J.-K and Matthew, 2000**).

- **Source végétale**

L'étude des polysaccharides végétaux passe en premier lieu par la prise de conscience de la très grande variabilité structurale en partie liée à leurs nombreuses fonctions biologiques (**Benaoun, 2017**). Les parois des cellules végétales sont essentiellement composées de polysaccharides, expliquant la part majoritaire de ces molécules dans la biomasse. On distingue deux groupes de polysaccharide végétaux selon leur fonction : les polysaccharides de réserve et les polysaccharides de structure. Les algues sont la plus grande source de polysaccharides végétaux qu'on appelle polysaccharides algaux (alginate).

- **Source bactérienne**

Parmi les polysaccharides bactériens les plus étudiés, le dextrane, produit par *leuconostoc mesenteroides* et la glucosine produite par *Agrobacterium tumefaciens* (**Singh et al., 2015**).

Les micro-organismes produisent une grande variété d'exo-polysaccharides ayant des caractéristiques physiques et chimiques uniques. Ces exo-polysaccharides peuvent être des homopolysaccharides ou des hétéropolysaccharides et en raison de leur structure unique, ils ont des applications potentielles dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (**LILLY et al., 1958**).

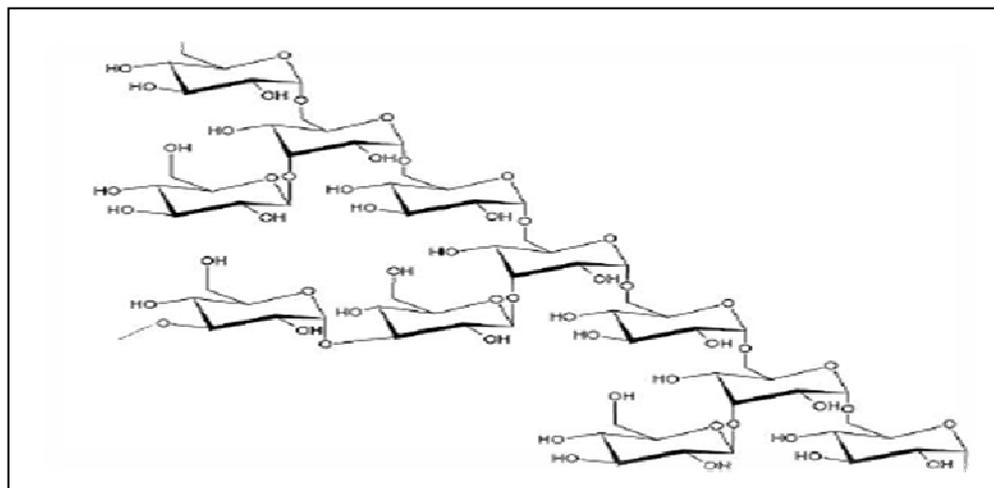


Figure 05. Structure du dextrane (**Birčáková et al., 2015**).

II.2.3. Les applications des polysaccharides en médecine

Les polysaccharides sont les principales substances nutritives de la plupart des organismes. Ils fournissent l'énergie et les carbones nécessaires pour la biosynthèse de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et d'autres glucides (**MARIBEL PACHECO in GRIFFIN, 1994**).

Les herbes officinales, contenant des polysaccharides sont largement utilisées pour le traitement des maladies dans la médecine traditionnelle et moderne.

Les polysaccharides issus des plantes médicinales africaines ont des activités immunostimulantes et peuvent permettre de stimuler le système immunitaire dans le cas d'une fragilité de ce système par certaines maladies (**Angone et al., 2010**).

Les polysaccharides ont reçu, en raison de leurs propriétés immunomodulatrices, une attention particulière de la part des chercheurs œuvrant dans le domaine biomédical. Plusieurs polysaccharides fongiques ont en effet la particularité de stimuler les défenses de l'hôte en favorisant la maturation, la différenciation et la prolifération des cellules immunitaires, ce qui leur confère plusieurs propriétés thérapeutiques notamment des propriétés anticancérogènes, antibactériennes et antivirales (**Kim et al., 2001**).

II.2.4. Les activités biologiques des polysaccharides

La diversité structurale des polysaccharides quelle que soit leur origine (animal, végétal ou microbienne) confère à ses macromolécules de nombreuses activités biologiques. Grâce à leurs propriétés interactives et régulatrices, les polysaccharides participent au contrôle de l'activité cellulaire (prolifération, différenciation, adhésion et migration) mais également dans l'activité de nombreuses enzymes (**Collic-Jouault et al., 2004**).

II.2.4.1. Activité anti diabétique

L'incidence du diabète a considérablement augmenté, et devient la troisième maladie chronique grave après le cancer et les maladies cardiovasculaires (**Zhu et al., 2014**).

Zhou et al. (2015) ont étudié l'activité hypoglycémique et les mécanismes potentiels des polysaccharides issus de *Misgurnus anguillicaudatus* chez les souris diabétiques.

L'administration orale de ces polysaccharides diminue de manière significative les niveaux de glucose, des triglycérides, de cholestérol total et des lipoprotéines de basse densité-cholestérol (LDL-cholestérol) sanguins et augmente les niveaux des lipoprotéines de haute densité-cholestérol (HDL-cholestérol) et d'insuline chez les souris diabétique, parallèlement à une augmentation du poids du corps et le contenu de l'insuline du pancréas.

Ces polysaccharides présentent aussi des activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes puissantes, comme en témoignent la diminution de facteur de nécrose tumorale- α , (TNF- α) et d'interleukine-6, il améliore également de façon significative les marqueurs sanguins de l'insuffisance hépatique et la fonction rénale chez les souris diabétiques.

II.2.4.2. Activité anti-oxydante

Selon (**Badrinathan et al., 2012**), les polysaccharides sulfatés ont montré une bonne activité de piégeage des radicaux à de faibles concentrations. Selon (**Li et al., 2015**), l'activité antioxydant la plus forte exprimée pour la protection du corps humain contre les dommages causés par les ERO, est notée pour le fucoïdane suivie d'alginate et de laminarane.

II.2.4.3. Activité hépato protectrice

Quan et al. (May 2013) ont testé l'effet protecteur des polysaccharides de *Boschnia kiarossica* (Orobanchaceae) contre l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone. Le tétrachlorure de carbone entraîne une augmentation du taux du facteur de nécrose tumorale- α du sérum et du niveau d'oxyde nitrique hépatique, et la régulation positive inductible des protéines de l'oxyde nitrique synthétase et cyclo-oxygénase-2 de tissu hépatique.

Le prétraitement des souris avec des polysaccharides isolés de *Boschniakia rossica* inverse ses paramètres. Un effet hépatoprotecteur de polysaccharides de *B. rossica* est signalé par l'examen histopathologique des coupes du foie. Les résultats indiquent que les polysaccharides de *B. Rossica* jouent un rôle protecteur dans l'atteinte hépatique aiguë induite par le tétrachlorure de carbone. Un effet hépatoprotecteur des polysaccharides de *B. rossica* peut être dû à des potentiels de défense antioxydante élevée, qui suppriment les réponses inflammatoires et l'apoptose des tissus du foie.

II.2.4.4. Activité anticancéreuse

Le cancer est décrit comme un ensemble hétérogène de cellules qui se développent dans des microenvironnements tumoraux avec une écologie complexe. Les traitements anticancéreux classiques, comme la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, montrent des limites en raison du mauvais pronostic et les effets secondaires graves. De nos jours, une attention croissante est axée sur les produits naturels dans une tentative pour rechercher de nouveaux agents anticancéreux efficaces avec moins d'effets toxiques (**Bao et al., 2013**).

De nombreuses études ont suggéré que les polysaccharides peuvent inhiber la croissance tumorale par des mécanismes communs comme la prévention de l'oncogenèse par la consommation orale de préparations actives; une activité anticancéreuse directe, telle que l'induction de l'apoptose des cellules tumorales; l'activité immunopotentialisation associée à une chimiothérapie et l'inhibition de la métastase tumorale (**Zong et al., 2012**).

II.2.4.5. Activité anticoagulante

Selon **Souza et al. (2015)**, les polysaccharides sulfatés isolés à partir d'algues marines et les invertébrés constituent un groupe complexe de macromolécules qui sont largement étudiés comme anticoagulants et anti-thrombotiques dépourvus du risque indésirable d'hémorragie.

D'après **Mulloy a.B et al. (2000)**, quatre classes distinctes de polysaccharides sulfatés (héparine, dermatane-sulfate, chondroïtine sulfate fucosylé et fucoidane des algues) ont toutes une activité anticoagulante, due à leur interaction avec les enzymes et les inhibiteurs du système de la coagulation.

II.2.4.6. Activité anti virale

Les polysaccharides sulfatés extraits d'algues ont des propriétés antivirales et sont beaucoup moins cytotoxiques que les médicaments conventionnels. Les agents antiviraux et la chimiothérapie combinés peuvent offrir plus d'avantages que la monothérapie et accroître l'efficacité, la puissance et le retard de l'émergence de virus (**Aguilar-Briseno et al., 2015**).

III. Matériel et méthodes

Cette étude a pour but d'évaluer quelques activités *in vitro* de deux différents extraits polysaccharidiques (enzymatique et par l'eau chaude) des graines de pin d'Alep. Les tests biologiques portent sur l'activité antioxydant, l'activité anti microbienne et l'activité anti hémolytique.

III.1.1. Matériel végétal

La récolte des cônes de pin d'Alep a été effectuée dans le parc notionnel de Djurdjura (Wilaya de Bouira), ils ont ensuite été mis dans de l'eau chaude pour faire dissoudre la résine et donc provoquer l'ouverture des cônes ce qui permettra la récupération des graines. Ces dernières ont été lavées pour éliminer les impuretés et un séchage a été effectué en deux étapes, un prés séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière pour éliminer l'excès d'eau puis dans l'étuve ventilée à 40 C° pendant 48 heures. Elles ont ensuite été broyées, une fine poudre homogène a été récupérée et stockée à sec.



Figure 06 : Carte géographique de la wilaya de Bouira

III.1.2. Matériel instrumental et réactifs chimiques

Tableau II : Matériel instrumental et réactifs chimiques

Réactifs	Appareillages
✓ Chloroforme ;	✓ soxhlet ;
✓ Méthanol ;	✓ Bain marie (nuve batch/20nb) ;
✓ Trypsine ;	✓ Centrifugeuse (EZ Swing 3K) ;
✓ Acétone ;	✓ Etuve (venticell) ;
✓ Hydroxyde de sodium (Na Oh) ;	✓ Agitateur ;
✓ Eau distillé ;	✓ Lyophilisateur ;
✓ Ethanol ;	✓ Rota vapeur ;
✓ Na Cl ;	✓ pH mètre(HI2211ph10RP meter) ;
✓ Butanol.	✓ Bec benzène
✓ Le sang (les érythrocytes)	
✓ Tampon PBS	
✓ H ₂ O ₂	
✓ Acide ascorbique	
✓ DPPH	
✓ L'eau physiologique	
✓ Milieu de culture MH	
✓ Milieu de culture PDA	

III.2. Méthodes

III.2.1. Extraction des polysaccharides

III.2.1.1. Délipidation

La poudre des graines de *Pinus halepensis* Mill. a d'abord été délipidée par soxhlet avec comme solvant chloroforme/méthanol avec un rapport de 2 : 1 (v :v) (Kadri et al., 2014).

III.2.1.2. Extraction enzymatique

L'extraction a été faite selon le protocole de Silva T.M.A. et al. (2005). La poudre a été dissoute dans une solution NaCl 0.25M et mise en contact avec la trypsine. Le mélange a été

soumis à une filtration puis une précipitation avec de l'acétone et enfin le culot récupéré a été lyophilisé. Le protocole détaillé est représenté dans la figure 07.

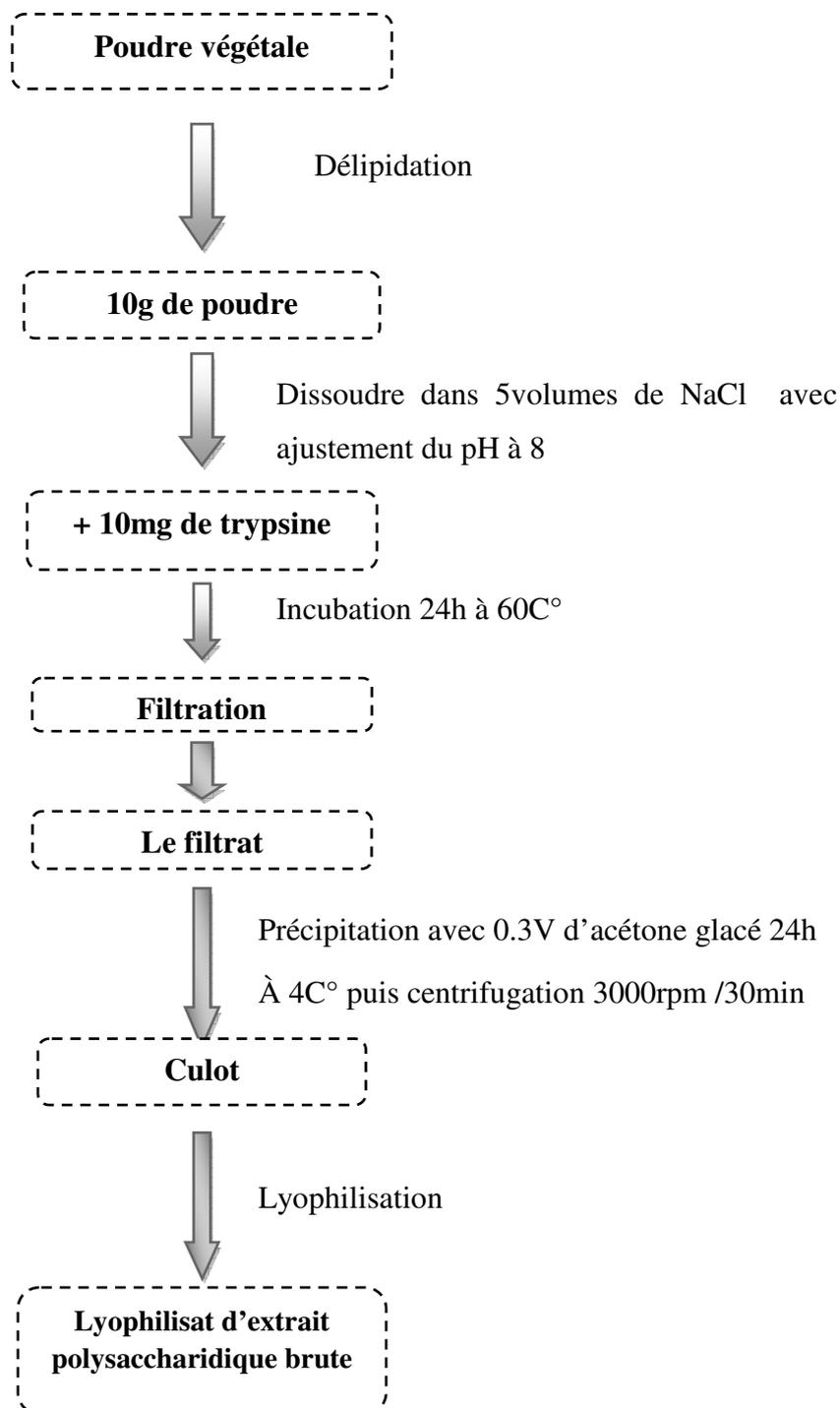


Figure 07 :Schéma représentant les différentes étapes d'extraction enzymatique (SilvaT.M.A. et al., 2005).

III.2.1.3. Extraction par l'eau chaude

La poudre délipidée a été dissoute dans de l'eau chaude puis filtrée. Le filtrat a ensuite été concentré, déprotéinisé et précipité par l'éthanol. Après centrifugation, le culot a été lavé par l'acétone puis lyophilisé (**Deng et al., 2014; Li et al., 2014**). Le protocole détaillé est représenté dans **la figure 08**

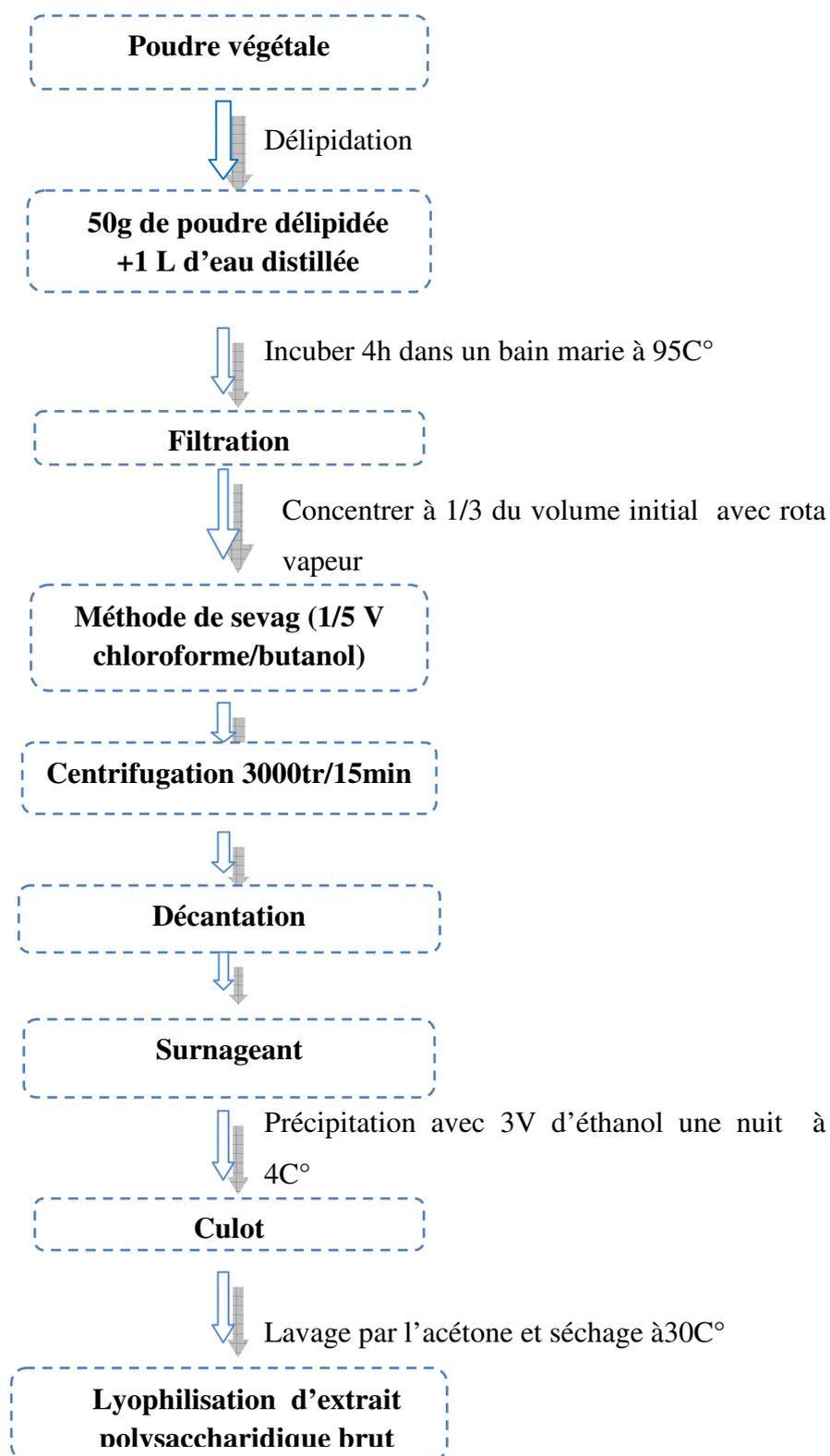


Figure 08 : Les différentes étapes d'extraction par l'eau chaude (Deng et al., 2014; Li et al., 2014)

Le rendement d'extraction des polysaccharides brutes pour les deux extraits a été calculé selon la formule suivante (Li et al., 2015) :

$$\text{Rendement d'extraction} = (M / M_i) \times 100$$

M : masse d'extrait brute obtenu.

M_i : masse initiale de la poudre végétale.

III.2.2. Evaluation des activités biologiques

III.2.2.1. Activité anti hémolytique sur les érythrocytes humains

L'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyse médicale de l'hôpital M'chedallah. Pour effectuer cette activité, des échantillons de sang récoltés à partir de volontaires sains et qui ne présentent aucun déficit en facteurs de coagulation. Le sang a été recueilli dans des tubes héparinés.

➤ Préparation des érythrocytes

La suspension érythrocytaire a été préparée selon le Protocole de (Alinezhad et al., 2012; Ebrahimzadeh et al., 2010; Naim et al., 1976), le sang a été centrifugé à 1500 g pendant 10 min pour éliminer le plasma et les couches des globules blancs. Les érythrocytes contenus dans le culot ont été lavés 3 fois avec du tampon phosphate (à 0,2 M et pH 7,4).

• Mode opératoire

Une suspension érythrocytaire à 4% a été préparée dans du PBS (0,2 M à pH 7,4), 2 ml de cette suspension ont été ajoutés à 0,5 ml de chaque extrait à tester à différentes concentrations (10ug – 100ug et 1 mg /ml). Le milieu a été dilué en le complétant avec du PBS jusqu'à 5ml dans chaque tube à essai. Le mélange obtenu a été incubé pendant 5 min à température ambiante. Un volume de 0,5 ml de H₂O₂ à 1M préparé dans le PBS a été ajouté pour induire la peroxydation des lipides membranaires des érythrocytes, le mélange a été incubé pendant 2h dans un bain marie à 37C°, puis les échantillons ont été centrifugés à 1000g pendant 10 min. Ensuite, le surnageant récupéré de chaque tube a été aspiré et passé à la lecture des DO à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le control a été préparé en mélangeant 2 ml de la suspension érythrocytaire à 4% avec 0,5 ml d'H₂O₂ et compléter avec le PBS jusqu'à 5ml qui représente le control négatif et est considéré comme hémolyse totale (100%)

L'acide ascorbique a été utilisé comme standard dans les mêmes conditions que l'extrait. Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse a été calculé selon la formule décrite au-dessous :

$$\% \text{ d'inhibition d'hémolyse} = (AC - Ae / AC) * 100$$

Dont :

AC : c'est l'absorbance obtenus après l'hémolyse totale

Ae : c'est l'absorbance obtenus en présence d'échantillon

III.2.2.2. Etude de l'activité anti-oxydante

L'oxydation est essentielle à de nombreux organismes vivants pour la production d'énergie des processus biologiques (Li et al., 2011). Les radicaux libres dérivés de l'oxygène sont nocifs pour la santé humaine. Les radicaux libres sont des molécules hautement réactives avec un ou plusieurs électrons non appariés. Pendant le stress oxydatif, les radicaux libres sont libérés pour attaquer les organismes vivants, y compris leur ADN, ARN, protéines et autres substances, et éventuellement causer des lésions cellulaires, nécroses ou apoptose conduisant à des troubles corporels et diverses maladies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète et le vieillissement (Hu et al., 2011).

L'évaluation de la capacité antioxydant de l'extrait polysaccharidique dans cette étude, a été effectuée suivant le test de 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH) au niveau du laboratoire de biochimie de l'université de Bouira.

- **Mesure de l'activité scavenger du radical DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)**

Le DPPH est un radical libre stable caractérisé par sa couleur violette foncée qui va disparaître après la réduction par un antioxydant donneur des protons (Hydrogène), plus la perte de couleur est importante et rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort. La perte de couleur peut être suivie par la mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 515nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante (Chen et al., 2014).

$$P(\%) \text{ inhibition} = (\text{absorbance de control} - \text{absorbance de l'échantillon} / \text{absorbance de control}) * 100$$

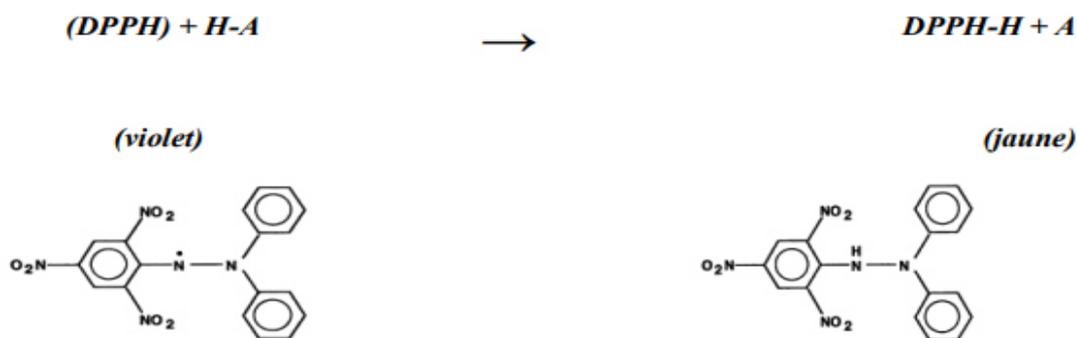


Figure 09. Schéma de réduction du radical DPPH

- **Mode opératoire**

Cette activité a été évaluée selon le protocole de **Djerrad et al. (2015)**. Une solution de DPPH à 60 μM a été préparée. Une masse de 2,4 mg de poudre de DPPH a été dissout dans 100 ml de méthanol. L'absorbance de cette solution a été contrôlé en la mesurant à 517 nm par un spectrophotomètre avant de commencer les tests sur les extraits et a été de 0,554.

Les échantillons ont été préparés à une concentration de 1 mg/ml dans du méthanol. 25 μL de la solution a tester a été ajouté à 975 μL de la solution de DPPH (3 essais ont été effectués). Le milieu réactionnel a été incubé pendant 30 min à l'obscurité totale. La lecture des DO a été effectuée à 517 nm.

Le calcul de pourcentage de piégeage du radical de DPPH a été donné par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de DPPH} = (A_0 - A / A_0) \times 100$$

Où :

A_0 : l'absorbance de la solution de DPPH seule.

A : l'absorbance de DPPH en présence de l'extrait (**Athamena et al., 2010**).

III.2.2.3. Etudes de l'activité anti microbienne

Les tests de l'activité antibactérienne ont été réalisés au niveau du *Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens* à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

Quatre souches bactériennes (2 Gram positifs et 2 Gram négatifs) et trois souches fongiques ont été utilisés pour déceler l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait polysaccharidique de *P. halepensis* Mill.

Les bactéries pathogènes ;

- ✓ *Staphylocoque aureus* ATCC 6538 (Gram +)
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 8739 (Gram -)
- ✓ *Pseudomonas aerogenosa* ATTC 9027 (Gram -)
- ✓ *Listeria monocytogenese* (Gram +)

Les champignons ;

- ✓ *Aspergillus flavus*
- ✓ *Aspergillus niger*
- ✓ *Aspergillus ochraceus* ATTC3174

➤ Mode opératoire

L'activité a été mesurée selon le protocole de **El Kabouss et al. (2011)** avec quelques modifications.

- **Milieux de culture**

Les bactéries ont été cultivées sur milieu Muller Hinton gélosé (Beckton Dickinson) qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Pour les champignons, ils ont été cultivés sur milieu PDA.

- **Préparation des suspensions de microorganismes.**

A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été raclées à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée et ont été déchargée dans 15 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %.

La suspension bactérienne a été bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland ou à une DO de 0,08 à 0,10 avec une lecture à 625 nm.

- **L'ensemencement**

Un volume de 100µl a été prélevé de la suspension bactérienne (germe ciblé) et versé dans 50 ml de milieu de culture. Ensuite, les boîtes coulées ont été séchées pendant 15 minutes devant un bec benzène.

Après la solidification des boîtes à l'aide d'un emporte-pièce stérile, des puits de 10 mm de diamètre ont été pratiqués dans les géloses, ensuite chaque puits a été rempli par différents volumes d'extraits (60,40 et 120 µl). Enfin, les boîtes ont été incubées pendant 24h dans l'étuve à 37° C pour les bactéries et à 30° C pendant 48h pour les champignons.

Ces différentes étapes ont été appliquées pour chaque germe.

- **Lecture**

La lecture a été faite après 24h pour les bactéries et 48h pour les champignons par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (diamètre de l'auréole d'inhibition du germe-cible au tour des puits).

III.2.3. Analyse statistique

Toutes les données de cette étude sont exprimées en moyenne \pm Ecart type à partir d'expériences individuelles. La signification statistique a été analysée en utilisant l'analyse unidirectionnelle de variance (ANOVA) avec le Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 13.0) software. *P* valeurs inférieures à 0.05 ont été considérées comme significatives.

IV. Résultats et discussion

IV.1. Rendement d'extraction

L'extraction des polysaccharides à partir de graines de *Pinus halepensis* Mill. a été effectué par deux méthodes d'extraction : extraction enzymatique (extrait I) et par l'eau chaude (extrait II). Les résultats des différents rendements d'extraction sont représentés dans le tableau III.

Tableau III. Rendement d'extraction des polysaccharides

Méthode enzymatique	Méthode par l'eau chaude
1,4% ± 0,41	0,13% ± 0,03

Le rendement des polysaccharides de *P. halepensis* Mill. varie selon la méthode d'extraction. On remarque que le pourcentage le plus élevé a été signalé pour la méthode enzymatique avec un pourcentage de 1,4% ± 0,41 suivis d'un pourcentage de 0,13% ± 0,03 pour la méthode de l'eau chaude. Sachant que pour la méthode d'eau chaude une déprotéinisation a été réalisée contrairement à la méthode enzymatique dont les protéines ont juste été hydrolysées pour libérer les polysaccharides, donc cette différence peut être expliquée par la différence en degrés de pureté et une éventuelle présence de protéines hydrolysées dans l'extrait. De plus, le protocole d'extraction par trypsine a été plus long que celui de l'eau chaude. Cela peut être une autre hypothèse pouvant expliquer cette différence.

Huang, Li et al. (2010) ont rapporté que le rendement des polysaccharides augmente avec l'augmentation du temps, ce résultat est en accord avec le résultat que nous avons obtenu pour la méthode enzymatique qui a été préalablement incubé pendant 24h contrairement à la méthode enzymatique ou l'incubation a été effectuée pendant 4h seulement.

Les différences des rendements peuvent aussi être expliquées par la saison et la période de la récolte ainsi que l'état physiologique des plantes, sachant que les polysaccharides sont des métabolites primaires, ils sont donc utilisés comme des précurseurs d'autres métabolites secondaires comme source d'énergie. De même, elles peuvent être expliquées par les différences des conditions expérimentales au laboratoire, protocoles d'extraction, le degré de pureté d'alcool utilisé dans la précipitation et le volume utilisé (**Ebringerová, Kardošová et al. 2003**).

Les résultats de rendements obtenus ne sont pas loin de ceux de **Muralikrishna, Ramadas Bhat et al. (1987)** qui ont signalé un rendement de 1,1 % d'extrait polysaccharidique à partir de Cowpea (*Vignasinensis*). **Li and Zhang (2009)** ont aussi rapporté un rendement de 0,67 % de polysaccharides hydrosolubles des racine d'*A. Membranaceus* et **Dong, Yao et al. (2007)** ont noté un rendement de 1,63 % pour les polysaccharides chez *C. diserticola*.

IV.2. Evaluation de l'activité anti oxydante et anti hémolytique.

IV.2.1. Inhibition du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Dans cette étude, l'activité antioxydante des deux extraits polysaccharidiques de *P. halepensis* Mill. a été évaluée par le test d'inhibition du radical DPPH.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits testés en fonction d'une concentration de 1 mg/ml est montré sur la figure suivante :

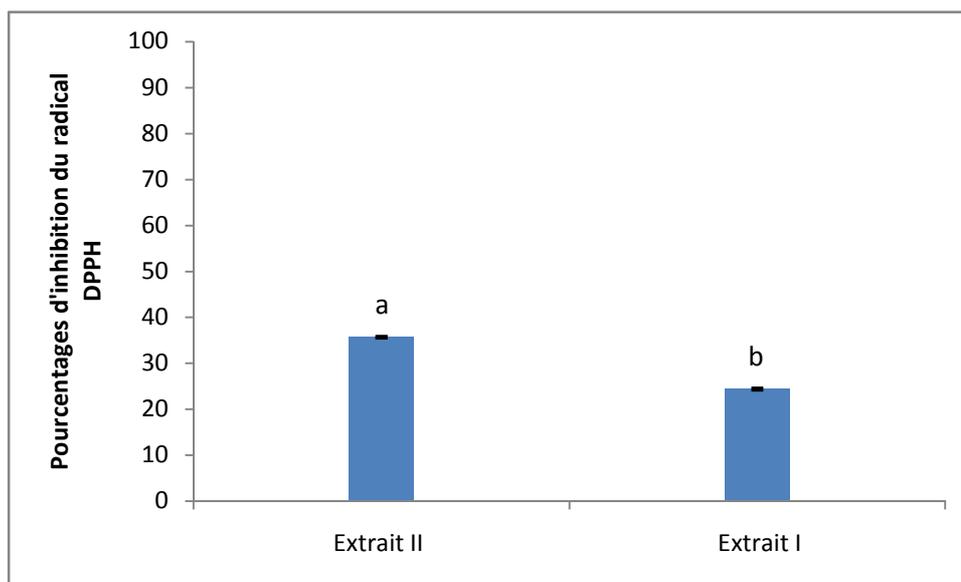


Figure 10. Pourcentage d'inhibition de radical DPPH (Extrait I : extraction enzymatique; extrait II : eau chaude). Les valeurs sont exprimées en moyennes (\pm) erreurs standard de trois déterminations. Les concentrations avec la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P = 0,05$) selon le test de Newman-Keuls.

A température ambiante, le radical DPPH présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance capable de saturer sa couche électronique. Cette réduction de la couleur rend compte du pouvoir piègeur des molécules testées. Ainsi toute substance capable d'induire un changement de couleur du DPPH du violet au jaune est

considérée comme un piègeur du radical DPPH et par conséquent comme antioxydant. Pour cela, l'inhibition du DPPH radicalaire des deux extraits polysaccharidique a été évaluée par la méthode de **Djerrad, Kadik et al. (2015)** à la concentration de 1mg/ml.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits polysaccharidiques des graines de *P. halepensis* Mill. était de $24,34\% \pm 0,3$ pour l'extrait I et $35,62\% \pm 0,21$ pour l'extrait II à une concentration de 1 mg/ml. Ces résultats montrent l'existence d'un effet scavenger des extraits sur ce radical.

La méthode d'extraction peut fortement affecter l'activité anti oxydante (**Chen, Zhang et al. 2008**). Il a été clairement démontré que l'extraction hydrosoluble à chaud représente la méthode la plus efficace dans la préservation de l'activité antioxydant des polysaccharides (**Liu, Wen et al. 2015**). Cela corrobore avec notre résultat obtenu pour l'extrait II (par eau chaude) qui a été le plus actif avec un pourcentage de $35,62\% \pm 0,21$ par rapport à l'extrait I.

Ces résultats peuvent probablement être dus à l'existence de nombreux groupes hydroxyles dans la molécule de polysaccharide, ce qui pourrait être le donneur d'électrons au DPPH (**Li, Zhang et al. 2015**). De plus, il a été proposé que le mécanisme anti oxydant possible des polysaccharides peut impliquer le don d'hydrogène afin de briser la chaîne des réactions et la capacité de piégeage des radicaux libres résultant de l'abstraction de l'hydrogène anomérique des unités monosaccharidiques internes des polysaccharides (**Han, Shen et al. 2015**).

Il a été démontré par **Tian, Zha et al. (2013)** que l'effet de piégeage du radical DPPH par l'extrait polysaccharidique de *Dendrobium huoshanense* Orchidaceae avec des taux d'inhibition allant de 31,4% à 38,7% à des concentrations en polysaccharides allant de 1,0 à 2,0 mg/ml, ce qui concorde avec nos résultats. De même, les polysaccharides du soja noir ont montré une activité anti oxydante contre le DPPH avec un pourcentage de 30,11% pour une concentration de 1,0 mg/ml (**Liu, Wen et al. 2015**). Ces résultats sont semblables à ceux enregistrés par nos extraits polysaccharidiques des graines de *P. halepensis* Mill.

D'après **Yan, Yu et al. (2011)** et **Zhong, Jin et al. (2010)** les polysaccharides sont très réactifs et ont principalement une forte activité anti radicalaire et donc une bonne activité anti-oxydante.

Il a été rapporté que les capacités anti oxydantes des polysaccharides dépendent généralement de l'unité d'oses, des liaisons glycosidiques, du degré de ramifications, de la conformation du polysaccharide et leur composition chimique (**Li, Nie et al. 2013**).

IV.2.2. Activité anti hémolytique

La capacité anti hémolytique des deux extraits polysaccharidiques a été mesurée par un test qui consiste à soumettre les érythrocytes à une agression radicalaire induite par le peroxyde d'hydrogène.

Les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse ont été présentés dans la figure suivante :

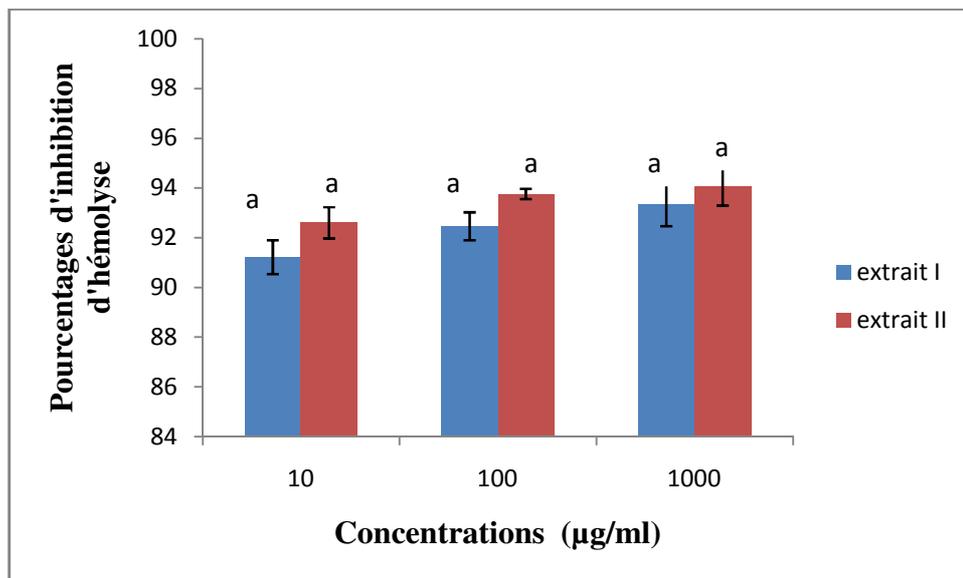


Figure 11. Pourcentage d'inhibition d'hémolyse pour l'extrait I et II. (Extrait I : extraction enzymatique; extrait II : eau chaude). Les valeurs sont exprimées en moyennes (\pm) erreurs standard de trois déterminations. Les concentrations avec la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P = 0,05$) selon le test de Newman-Keuls.

➤ Aspect macroscopique des échantillons sanguins



(A) Sang+PBS+H₂O₂

(B) Sang+PBS+H₂O₂+Extrait

Figure 12. Photos représentant l'aspect du sang avant (A) et après (B) traitement par les polysaccharides des graines *P. halepensis* Mill.

L'observation macroscopique, du contrôle positif et des échantillons traités avec les extraits, montre clairement que le contrôle positif est d'une couleur rouge foncée qui traduit l'éclatement des érythrocytes et la libération d'hémoglobine. Contrairement aux échantillons traités ou nous avons remarqué un culot qui se forme au fond du tube qui représente les érythrocytes intacts et un surnageant transparent révélant l'absence d'hémoglobine, cela montre que les polysaccharides ont protégé les érythrocytes de la lyse.

Les extraits polysaccharidiques (I et II) ont présenté une forte activité anti-hémolytique. Le pourcentage d'inhibition a varié très légèrement avec la concentration dans une gamme de 91% à 94% avec une comparaison au standard utilisé qui est l'acide ascorbique dont son pourcentage d'inhibition est observé entre 84 % à 94,86 %.

A une concentration de 10 µg/ml nous avons signalé un pourcentage d'inhibition de $91,22 \pm 0,68\%$ et $92,59\% \pm 0,63\%$ pour l'extrait I et II respectivement, en revanche pour une concentration de 100 µg/ml les pourcentages d'inhibition d'extrait I et II étaient de $92,46 \pm 0,56\%$ et $93,75 \pm 0,20\%$ respectivement, enfin pour une concentration de 1000 µg/ml, les pourcentages d'inhibitions étaient de $93,35 \pm 0,89\%$ pour l'extrait I et $94,07 \pm 0,78\%$ pour l'extrait II, avec une différence non significative.

L'effet des polysaccharides sur le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui épuise les protéines membranaires, déforme la membrane des érythrocytes et perturbe les micro-constituants ce qui conduit à leur lyse libérant ainsi l'hémoglobine et qui été utilisé dans cette étude pour provoquer l'hémolyse. Certains chercheurs ont justifié la capacité de l'extrait polysaccharidique isolé à partir des tiges de certaines plantes à l'exemple d' *Acanthopanax koreanum* Naka à piéger le peroxyde d'hydrogène est due au pouvoir antioxydant de ces extraits (Kang, Kim et al. 2015). Cela indique que l'activité anti hémolytique des extraits polysaccharidiques des graines de *P. halepensis* Mill. est probablement due à l'activité anti radicalaire de ces extraits qui a été prouvée dans le test de l'activité anti oxydante. En d'autres termes ces extraits polysaccharidiques peuvent bloquer l'action néfaste des radicaux libres qui attaquent les acides gras insaturés dans la membrane en produisant une peroxydation lipidique et une diminution de la fluidité membranaire en les piégeant.

IV.3. Activité anti microbienne

L'activité antimicrobienne des extraits polysaccharidiques des graines de *P.halepensis* Mill. a été traduite par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits remplis d'extraits bruts étudiés.

Le tableau suivant montre les diamètres des zones d'inhibition de croissance des microorganismes (*Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* *listeria monocytogenese*) ainsi que (*Aspergillus Niger* ,*aspergillus flavus* et *aspergillus ochraceus*) en présence des deux extraits polysaccharidiques.

Tableau IV : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) obtenu pour les différentes souches cibles par les deux extraits polysaccharidiques des graines de *P. halepensis* Mill..

Concentration 50mg/ml	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Extrait I	10 mm	-	-	8 mm	14 mm	20 mm	10 mm
Extrait II	12 mm	-	-	11 mm	12 mm	13 mm	11 mm

Les résultats des tests de l'activité antimicrobienne des extraits polysaccharidiques sur les souches *E. coli* et *listeria monocytogenese* ont montré une légère sensibilité avec un diamètre de zones inhibition de 10 mm et 8 mm pour l'extrait I et 12 mm et 11 mm pour l'extrait II respectivement, contrairement aux souches *Pseudomonas aeruginosa* et *staphylocoque aureus* qui ont signifié l'absence de zone d'inhibition vis-à-vis des deux extraits polysaccharidiques. De même pour les souches fongiques (*AN* ,*Af*, *Ao*) qui ont signalé une sensibilité vis-à-vis des extraits polysaccharidiques avec des zones d'inhibition qui varient de 10 mm à 14 mm.

Les résultats obtenus par *E. coli* et *listeria monocytogenese* indique que nos extraits présentent un léger effet anti bactérien avec une légère apparition d'une zone d'inhibition qui peut être expliqué par la faible diffusion de nos extraits dans les milieux de culture. En revanche la résistance obtenus par la souche *P. aeruginosa* pour les extraits testés peut probablement être due à la présence des complexes enzymatiques sur ces micro-organismes qui contribuent à la dégradation de ces macromolécules en sucres simples pour pouvoir les utiliser comme source de carbone, ou encore, sachant que nos extraits ne sont pas purs, ces

impuretés peuvent avoir un effet antagoniste ou tout simplement empêcher l'action de ces polysaccharides en provoquant un encombrement stérique.

Il a été montré par **Berri, Slugocki et al. (2015)** que l'extrait polysaccharidique d'algue verte présente une sensibilité vis-à-vis les souches bactériennes *E. coli* et *Listeria monocytogenese* ce qui est en accord avec notre résultats. Par contre il a présenté aussi une sensibilité pour *staphylocoque aureus* contrairement à nos résultats. En revanche (**Abdelmalek, Sila et al. 2015**) a démontré la résistance d'*E .coli* de l'extrait polysaccharidique de *Loligo vulgaris* contrairement à notre extrait.

Conclusion

Dans cette étude, le potentiel anti-oxydant, anti-hémolytique et anti microbien de deux extraits polysaccharidiques des graines de *Pinus halepensis* Mill. préparés par deux méthodes d'extraction : méthodes enzymatique et par l'eau chaude ont été évalués

Les rendements d'extraction ont été respectivement de $1,4 \pm 0,41$ et $0,13 \pm 0,03$ % pour l'extrait enzymatique et par l'eau chaude respectivement et l'extrait à l'eau chaude s'est avéré plus actif que l'extrait enzymatique. Le test de réduction du DPPH montre que les extraits sont doués d'une activité anti oxydante assez importante en comparant à la bibliographie avec un pourcentage d'inhibition radicalaire de $24,34\% \pm 0,3$ et $35,62\% \pm 0,21$ respectivement à une concentration de 1mg/ml et ils représentent aussi une forte activité anti hémolytique avec un pourcentage qui varie entre 91% à 94%.

Les extraits polysaccharidiques brutes montrent un effet anti-microbien avec un effet sur les souches bactériennes d'*E. coli*, *Listeria monocytogenese* et les souches fongiques d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* . Tandis que les souches *pseudomonas aeroginosa* et *staphylocoque aureus* ont été trouvés résistant vis-à-vis des deux extraits polysaccharidiques

En perspectives de ces travaux, des études doivent être entreprises

A fin d'augmenter le rendement d'extraction des polysaccharides, il serait intéressant d'optimiser les conditions d'extraction à savoir la température, le temps et le type de solvants utilisés pour la précipitation en mesurant le degré de pureté.

Pour une meilleure évaluation de l'activité antioxydante, il serait préférable de les tester sur d'autres paramètres tel que le pouvoir réducteur, le pouvoir chélateur, la peroxydation lipidiques et le blanchiment de B-carotène à des différentes concentrations.

Ensuite, de doser, purifier et fractionner l'extrait afin de déterminer la fraction responsable de cette activité et d'identifier les groupements fonctionnel en effectuant une analyse structurale tel que L'IRTF et la RMN.

Il serait aussi souhaitable de tester d'autres activités biologiques citées dans la bibliographie telles que l'activité anti-coagulante, anti-diabétique, anti-cancereuse ...

Références bibliographiques

- Abdelmalek, B. E., A. Sila, et al. (2015). "Sulfated polysaccharides from *Loligo vulgaris* skin: Potential biological activities and partial purification." *Int J Biol Macromol* 72: 1143-1151.
- Acherar, M., Lepar, J., Debussche, M., 1984. colonisation des friches par le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Miller) en Languedoc méditerranéen. *Acta oecologica: oecologia plantarum*.
- Aguilar-Briseno, J.A., Cruz-Suarez, L.E., Sassi, J.F., Ricque-Marie, D., Zapata-Benavides, P., Mendoza-Gamboa, E., Rodriguez-Padilla, C., Trejo-Avila, L.M., 2015. Sulphated polysaccharides from *Ulva clathrata* and *Cladosiphon okamuranus* seaweeds both inhibit viral attachment/entry and cell-cell fusion, in NDV infection. *Marine drugs* 13, 697-712.
- Alinezhad, H., Baharfar, R., Zare, M., Azimi, R., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., 2012. Biological activities of ethyl acetate extract of different parts of *Hyssopus angustifolius*. *Pharmaceutical biology* 50, 1062-1066.
- Angone, S., 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.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., 2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal* 11, 69-81.
- Ayari, A., Salah, G., Daniel, M., 2014. Seed and Cone Production Patterns from Seventy-Nine Provenances of *Pinus halepensis* Mill. Across Tunisia Forests. *Global Journal of Botanical Science* 2, 65-74.
- BADOT, P.-M., GARREC, J.-P., 1993. Dépérissement local du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) le long du littoral méditerranéen.
- Badrinathan, S., Shiju, T.M., Sharon Christa, A.S., Arya, R., Pragasam, V., 2012. Purification and Structural Characterization of Sulfated Polysaccharide from *Sargassum myriocystum* and its Efficacy in Scavenging Free Radicals. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 74, 549-555.
- Bao, X., Yuan, H., Wang, C., Liu, J., Lan, M., 2013. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. *Carbohydr Polym* 98, 1236-1243.
- BARITEAU, M., 2005. Une sylviculture pour le pin d'Alep des Aurès (Algérie).
- Benaoun, F., 2017. Caractérisation Structurale et Potentiel Biologique des Polysaccharides issus de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) et *Urginea noctiflora* Batt. et Trab. (Liliaceae), ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT. Kasdi-Merbah (Ouargla), p. 231.
- Berri, M., C. Slugocki, et al. (2015). "L'activité antibactérienne et immunomodulatrice d'un extrait d'algue verte riche en polysaccharides sulfatés." *Journées Recherche Porcine* 47: 309-310.
- Birčáková, Z., Kollár, P., Weidenfeller, B., Füzér, J., Fáberová, M., Bureš, R., 2015. Reversible and irreversible DC magnetization processes in the frame of magnetic, thermal and

Références bibliographiques

electrical properties of Fe-based composite materials. *Journal of Alloys and Compounds* 645, 283-289.

Boual , Z., 2014 Caractérisation physico-chimique des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara Septentrional Est algérien): Activité biologique, *Sciences Biologiques*. Université Kasdi Merbah Ouargla. , p. 219.

Chen, H., M. Zhang, et al. (2008). "Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*)." *Food chemistry* 106(2): 559-563.

Chen, Q., Chen, J., Du, H., Li, Q., Zhang, G., Liu, H., Wang, J., 2014. Structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from the pulp of *Elaeagnus angustifolia* L. *International journal of molecular sciences* 15, 11446-11455.

Collic-Jouault, S., Zanchetta, P., Helley, D., Ratiskol, J., Sinquin, C., Fischer, A.M., Guezennec, J., 2004. [Microbial polysaccharides of marine origin and their potential in human therapeutics]. *Pathologie-biologie* 52, 127-130.

Daskalakou, E.N., Thanos, C.A., 1996. Aleppo pine (*Pinus halepensis*) postfire regeneration: the role of canopy and soil seed banks. *International Journal of Wildland Fire* 6, 59-66.

Debazac, E.-F., Tomassone, R., 1965. Contribution à une étude comparée des pins méditerranéens de la section *halepensis*, *Annales des Sciences Forestières*. EDP Sciences, pp. 213-256.

Deng, Y.Y., Yi, Y., Zhang, L.F., Zhang, R.F., Zhang, Y., Wei, Z.C., Tang, X.J., Zhang, M.W., 2014. Immunomodulatory activity and partial characterisation of polysaccharides from *Momordica charantia*. *Molecules* 19, 13432-13447.

Dhahri, A., 2017. Synthèse et caractérisation de nanocomposites conducteurs à base de « graphène » et de polysaccharides, *Matériaux, Dispositifs et Microsystèmes*. Lyon et l'Université de Monastir, p. 187.

Djerrad, Z., Kadik, L., Djouahri, A., 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 74, 440-449.

Dong, Q., J. Yao, et al. (2007). "Structural characterization and immunological activity of two cold-water extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* YC Ma." *Carbohydrate research* 342(10): 1343-1349.

Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Eslami, B., 2010. Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Central European journal of biology* 5, 338-345.

Ebringerová, A., A. Kardošová, et al. (2003). "Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants." *Fitoterapia* 74(1-2): 52-61.

El Kabouss, A., Charrouf, Z., Oumzil, H., Faid, M., Lamnaouer, D., Miyata, Y., Miyahara, K., 2011. Caractérisation des flavonoïdes des feuilles d'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels,

Références bibliographiques

Sapotaceae) et étude de leur activité antimicrobienne. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 21, 157-162.

Fady, B., Semerci, H., Vendramin, G.G., 2003. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Aleppo pine (*Pinus halepensis*) and Brutia pine (*Pinus brutia*). Bioersivity International.

Francis Suh.J.-K, Matthew, H.W.T., 2000. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21, 2589-2598.

Ghanmi, M., Satrani, B., Chaouch, A., Aafi, A., Abid, A.E., Ismaili, M.R., Farah, A., 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus hale-pensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica* 154, 293-300.

Han, X., S. Shen, et al. (2015). "Characterization and antioxidant activities of the polysaccharides from *Radix Cyathulae officinalis* Kuan." *Int J Biol Macromol* 72: 544-552.

Hu, W., Han, W., Huang, C., Wang, M.H., 2011. Protective effect of the methanolic extract from *Duchesnea indica* against oxidative stress in vitro and in vivo. *Environmental toxicology and pharmacology* 31, 42-50.

Huang, S.-Q., J.-W. Li, et al. (2010). "Optimization of alkaline extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their effect on immune function in mice." *Molecules* 15(5): 3694-3708.

Hughes, G.M., Boyland, E.J., Williams, N.J., Mennen, L., Scott, C., Kirkham, T.C., Harrold, J.A., Keizer, H.G., Halford, J.C., 2008. The effect of Korean pine nut oil (*PinnoThin™*) on food intake, feeding behaviour and appetite: A double-blind placebo-controlled trial. *Lipids in Health and Disease* 7, 6.

Husen, A., Pal, M., 2003. Effect of Nitrogen, Phosphorous and Potassium Fertilizers on Growth of Stock Plants of *Tectona grandis* (Linn. f.) and Rooting Behaviour of Shoot Cuttings. *Silvae genetica* 52, 249-253.

IUPAC-IUBMB, 1997. Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature of Carbohydrates. Recommendations 1996 *Eur. J. Biochemes* 9, 243.

Joseph, M.M., Aravind, S.R., George, S.K., Varghese, S., Sreelekha, T.T., 2013. A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts in vitro and in vivo anticancer activity. *Carbohydr Polym* 98, 1466-1475.

Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., Montero, J.-L., 2014. Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial Crops and Products* 54, 6-12.

Kadri, N., Khettal, B., Aid, Y., Kherfellah, S., Sobhi, W., 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.

Références bibliographiques

- Kang, M.-C., S.-Y. Kim, et al. (2015). "Antioxidant activity of polysaccharide purified from *Acanthopanax koreanum* Nakai stems in vitro and in vivo zebrafish model." *Carbohydrate Polymers* 127: 38-46.
- Kim, D.-H., Yang, B.-K., Jeong, S.-C., Park, J.-B., Cho, S.-P., Das, S., Yun, J.-W., Song, C.-H., 2001. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnology letters* 23, 513-517.
- Leite.E.L., 2005. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. *Mtieodni coafl aa nhde Bteiorolofugiccaanl R freosema rbrcho* 38, 523-533.
- Li, J., Liu, Y., Fan, L., Ai, L., Shan, L., 2011. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Zizyphus Jujuba* cv. *Jinsixiaozao*. *Carbohydrate Polymers* 84, 390-394.
- Li, B., X. Zhang, et al. (2015). "Characterization and antioxidant activities of acidic polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Markino." *Carbohydrate Polymers* 127: 209-214.
- Li, J.-E., Nie, S.-P., Xie, M.-Y., Li, C., 2014. Isolation and partial characterization of a neutral polysaccharide from *Mosla chinensis* Maxim. cv. *Jiangxiangru* and its antioxidant and immunomodulatory activities. *Journal of Functional Foods* 6, 410-418.
- Li, J.-E., S.-P. Nie, et al. (2013). "Chemical composition and antioxidant activities in immunosuppressed mice of polysaccharides isolated from *Mosla chinensis* Maxim cv. *jiangxiangru*." *International immunopharmacology* 17(2): 267-274.
- Li, S.-g. and Y.-q. Zhang (2009). "Characterization and renal protective effect of a polysaccharide from *Astragalus membranaceus*." *Carbohydrate Polymers* 78(2): 343-348.
- Li, Y.J., Lin, D.D., Jiao, B., Xu, C.T., Qin, J.K., Ye, G.J., Su, G.F., 2015. Purification, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharide from *Cissus pteroclada* Hayata. *International journal of biological macromolecules* 77, 307-313.
- Nahal, I., 1962. *Le Pin d'Alep (Fines halepensis Mill.). Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole.*
- Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A., Birk, Y., 1976. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 1174-1177.
- Newton, A.C., Allnutt, T., Dvorak, W., Del Castillo, R., Ennos, R.A., 2002. Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers. *Heredity* 89, 191.
- Parde, J., 1957. *La productivité des forêts de Pin d'Alep en France.*
- Pasman, W.J., Heimerikx, J., Rubingh, C.M., van den Berg, R., O'Shea, M., Gambelli, L., Hendriks, H.F., Einerhand, A.W., Scott, C., Keizer, H.G., 2008. The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids in Health and Disease* 7, 10.

Références bibliographiques

Pasqualini, V., Robles, C., Garzino, S., Greff, S., Bousquet-Melou, A., Bonin, G., 2003. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere* 52, 239-248.

SELADJI, D., 2014. Compositions chimiques, propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des racines de trois pinaceae d'Algérie.

Sghaier, T., Ammari, Y., 2012. Croissance et production du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Tunisie. *Revue internationale d'écologie méditerranéenne International Journal of Mediterranean Ecology* 38, 39.

SilvaT.M.A., Alves.L.G., Queiroz.K.C.S. de, Santos.M.G.L, Marques.C.T., Chavante.S.F, Rocha.H.A.O, Leite.E.L., 2005. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. *Mtiedni coafl aa nhde Bteiorolofugiccaanl R freosema rbcrho* 38, 523-533.

Résumé

L'utilisation des graines de *Pinus halepensis* Mill. remonte à l'antiquité que ça soit en cuisine ou en médecine traditionnelle. Dans ce travail l'activité anti-hémolytique, anti-oxydante et antimicrobienne des extraits polysaccharidiques brutes ont été étudiées. Pour cela, le broyat de ces graines a été soumis à une extraction par deux méthodes différentes dont la première est la méthode enzymatique qui a donné un rendement de $1,4\% \pm 0,41$ et la deuxième réalisée par l'eau chaude a donné un rendement beaucoup moindre de $0,13\% \pm 0,03$. L'activité anti oxydante testée pour ces deux extraits a signalé un pourcentage d'inhibition de radical DPPH de $24,34\% \pm 0,3$ et $35,62\% \pm 0,21$ respectivement pour une concentration de 1mg/ml. Le teste de l'activité anti hémolytique a révélé une très forte activité contre le peroxyde d'hydrogène pour les extraits polysaccharidiques avec un pourcentage d'inhibition d'hémolyse qui a varié dans une gamme de 91% et 94% pour différentes concentrations allant de 10µg/ml à 1000µg/ml. L'étude de l'activité anti microbienne des extraits de graines de *Pinus halepensis* Mill. sur différentes souches bactériennes a révélé que la souche à Gram négatif (*E. coli*) et à gram positif (*Listeria monocytogenes*) s'est révélé légèrement sensible vis-à-vis des deux extraits avec des zones d'inhibition de 8 mm à 10 mm respectivement pour l'extrait I (Extraction enzymatique) et 11 à 12 mm pour l'extrait II (Extraction eau chaude). Par contre, la souche *Pseudomonas aeruginosa* et *staphylocoque aureusse* se sont révélés non sensibles et aucune zone d'inhibition n'a été observée. Quant aux souches fongiques, les souches *Aspergillus Niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus*, les extraits indiquent une sensibilité avec des zones d'inhibition de 14 mm , 20mm ,10 mm pour l'extrait I et de 12 mm, 13 mm et 11 mm de diamètre pour l'extrait II respectivement.

Mots clés : *Pinus halepensis*, polysaccharides, activité anti oxydante, activité anti hémolytique, activité anti microbienne.

Abstract

The use of *Pinus halepensis* Mill seeds. goes back to ancient times whether in cooking or traditional medicine. In this anti-haemolytic, anti-oxidant and antimicrobial activity, crude polysaccharide extracts have been studied. For this, the ground material of these seeds was subjected to extraction by two different methods, the first of which was the enzymatic method which gave a yield of $1.4\% \pm 0.41$ and the second realized by hot water gave a much lower yield of $0.13\% \pm 0.03$. The antioxidant activity tested for these two extracts reported a percent inhibition of DPPH radical of $24.34\% \pm 0.3$ and $35.62\% \pm 0.21$ respectively for a concentration of 1 mg / ml. The tests of anti hemolytic activity revealed a very high activity against hydrogen peroxide to polysaccharide extracts with a percentage of haemolysis inhibition which varied in a range of 91% and 94% for different concentrations ranging from 10 µg / ml to 1000 µg / ml. The study of antimicrobial activity of *Pinus halepensis* Mill seed extracts. on different bacterial strains revealed that the Gram-negative strain (*E. coli*) and gram positive (*Listeria monocytogenes*) proved slightly sensitive to the two extracts with inhibition zones of 8 mm to 10 mm for extract I (enzymatic extraction) and 11 to 12 mm for extract II (hot water extraction) respectively. In contrast, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were found to be non-susceptible and no inhibition zone was observed. As for fungal strains, the strains *Aspergillus Niger*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*, the extracts indicate a sensitivity with zones of inhibition of 14 mm, 20mm, 10 mm for the extract I and 12 mm, 13 mm and 11 mm in diameter for extract II respectively.

Key words: *Pinus halepensis*, polysaccharides, antioxi

ملخص

استخدام بذور *Pinus halepensis* مطحنة. يعود إلى العصور القديمة سواء في الطبخ أو الطب التقليدي. في هذا النشاط المضاد للدم ، مضاد للأكسدة ومضاد للميكروبات ، تمت دراسة مستخلصات السكريد الخام. لهذا ، تم تعريض المادة الأرضية من هذه البذور إلى الاستخراج بطريقتين مختلفتين ، الأولى منها كانت الطريقة الأنزيمية التي أعطت عائدًا قدره $1.4\% \pm 0.41$ والثانية التي حققتها المياه الساخنة عائد أقل بكثير من $0.13\% \pm 0.03$. وأشار النشاط المضاد للأكسدة لاختبار هذه المقطعات اثنين من DPPH تثبيط جذري من $24.34\% \pm 0.3$ و $35.62\% \pm 0.21$ على التوالي في تركيز 1 / mg.

وكشفت اختبارات النشاط المضاد الانحلالي نشاط مرتفع جدا ضد بيروكسيد الهيدروجين لمقطعات السكريد مع نسبة تثبيط انحلال الدم التي تنوعت في مجموعة من 91% و 94% لتركيزات مختلفة تتراوح بين 10 ميكروغرام / مل إلى 1000 ميكروغرام / مل. دراسة النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص بذور طحالب *Pinus halepensis* على السلالات البكتيرية المختلفة كشفت أن سلالة سلبية الغرام *E.coli* والموجبة لصبغة جرام *Listeria* أثبتت حساسية قليلا مع مقطعات اثنين مع مناطق تثبيط 8 ملم إلى 10 ملم لمستخلص I الاستخلاص الأنزيمي) و 11 إلى 12 لاستخراج الثاني (استخراج الماء الساخن) على التوالي. وعلى النقيض من ذلك ، وجد أن *Pseudomonas aeruginosa* و *staphylococcus aureus* ولم تلاحظ أي منطقة تثبيط. أما بالنسبة للسلالات فطرية *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* و *Aspergillus ochraceus* تشير إلى وجود حساسية مع مناطق تثبيط 14 مم لـ 10م لاستخراج 1 و 12م و 13م و 11م مم و 11م مم لاستخراج 2 على التوالي

الكلمات المفتاحية

عديد السكريد ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للدم ، نشاط مضاد للميكروبات *Pinus halepensis*