

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



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

BENZITOUNE Nour el Imane & BOUTOUIL Djedjiga

Thème

*Mise en évidence de quelques activités biologiques d'un
extrait polyphénolique des graines de Pinus halepensis*

Soutenu le : 01 / 07 / 2018

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^{me}. MEKAOUI Nassima

INGENIEUR

CRD-Saidal. Alger

Co-Promoteur

M. CHERGUI Achour

MAA

Univ. de Bouira

Examineur

M^{me}. BELKADI Asma

DOCTEUR

CRD-Saidal. Alger

Invitée

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Nous commençons par remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté, l'amour du savoir et surtout le courage et la patience pour effectuer ce modeste travail.

*Nous exprimons notre profonde gratitude à notre promoteur le docteur **KADRI NABIL** d'avoir accepté de nous encadrer pour notre projet de fin d'études, ainsi que pour son soutien, ses remarques pertinentes et son encouragement.*

*Nos remerciements les plus cordiaux et toutes nos pensées de gratitude à notre Co-promotrice **M^{me}MEKAOUI NASSIMA** qui a codirigé notre projet avec plein de sagesse, de générosité et de gentillesse pendant toute la période du stage.*

Comme nous sommes très reconnaissantes à toute l'équipe de l'animalerie pour leurs conseils et leur aide dans la réalisation de la partie in vivo, en particulier

Dr. BELKADI ASMA ET Mr. DAHMANE MOUSSA.

*Nous adressons nos remerciements aux nombreuses personnes côtoyées dans les différentes équipes des laboratoires où nous avons réalisé les travaux de recherche de notre projet de fin d'études. Nous avons apprécié l'accueil, le soutien, l'amitié et/ou l'aide multiformes de chacun de vous. Nous voudrions ici exprimer notre gratitude à toutes et à tous. A défaut de pouvoir adresser un mot à chacun, nous remercions les membres de l'équipe CRD : **M^{me}Halli LATIFA**, **M^{elle}BOUBKER SIHEM**, **M^{me}TAKHEROUBT FAZIA** et **M^{elle}SALHA**.*

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

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à :

· Mes parents :

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

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

*A mes frères et sœurs : **Rachid, Arezki, Said et Salima***

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

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

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

Djedjiga

DEDICACES

Je dédie ce mémoire

*A la plus belle créature que Dieu a créé sur terre, à la source de tendresse, de patience et de générosité, ma mère « **Fatima** » .*

Qui a œuvré pour ma réussite de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

*A mon père « **Slimane** », aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi.*

*A mes précieux frères « **Sami, Hamza et Seif eddine** » qui n'ont jamais cessé d'être pour moi un exemple de persévérance, de courage et de générosité, aucune dédicace ne saurait exprimer tout ce que je ressens pour vous, je vous aime.*

*J'exprime mes profonds remerciements particuliers à ma grand-mère « **Khadra** », Mon conseiller, et amie fidèle, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi.*

*A ma petite amour, ma chère nièce « **Yasmine** ».*

*A ma belle-sœur « **Valentina** ».*

*Une spéciale dédicace à mon magnifique et merveilleux binôme qui compte énormément pour moi « **DjiDji** ».*

*A mon âme-sœur « **Ilhem** », je t'aime.
A toutes mes enseignantes qui m'ont marquée.*

Imane

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide aminée

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

AO : Antioxydants

Apo E : Apolipoprotéine E

CAT : Catalase

COX : Cyclooxygénase

CRD : Centre de Recherche et de Développement

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

EAG : Equivalent acide gallique

ENSA : École nationale supérieure agronomique d'Alger

EQ : Equivalents de quercétine

ERO : Espèce réactive d'oxygène

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Récepteur de glucocorticoïdes

HDL : High density lipoprotein

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

IκB : Inhibiteur de NFκB

IL : interleukine

iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible

Km : Kilomètre

LDL : Low density lipoprotein

LOX : Lipoxygénase

MCV : Maladies cardiovasculaires

mgEq AA/g : Milligrammes d'équivalent d'acide ascorbique par gramme

mgEq AG/g : Milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme

mgEq Q/g : Milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme

NFκB: nuclear factor-kappa B

Nm: Nanometer

NO: Monoxyded'azote

PGE2 : Prostaglandine E2

R° : Radicaux libres

ROOH: peroxydesorganiques

SOD: Super oxyde dismutase

TC: Toltal cholesterol

TG: Triglycerides

TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha **α**

UV : Ultraviolet

VLDL : Very low density lipoprotein

μl : Microlitre

LISTE DES FIGURES

Figure 01: photographies originales de l'arbre de <i>Pinus halepensis</i> (a), des aiguilles (b), des graines (c), des cônes (d).....	4
Figure 02 : La répartition de pin d'Alep dans le bassin méditerranéen	6
Figure 03 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué dans les oxydation biologique.....	9
Figure 04 : Rôle des ERO (espèces réactives de l'oxygène) dans la formation de la plaque d'athérosclérose et relations avec les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires	13
Figure 05: Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins	14
Figure 06 : Modulation pharmacologique des isoenzymes de la cyclo-oxygénase	16
Figure 07: Photographie du lieu d'élevage des souris et des rats (originale).....	18
Figure 08 : Montage soxhlet.	20
Figure 09 : Etapes d'extraction des composés phénoliques des graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	22
Figure 10 : Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH	25
Figure 11 : Protocole expérimentale de l'activité anti-inflammatoire.	29
Figure 12 : Photographie d'une injection intra-péritonéale (originale).....	30
Figure 13: Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits éthanolique et aqueux.	33
Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux.	34
Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	35
Figure 16 : L'Index Athérogénique (IA) des différents groupes testés.	39
Figure 17: Pourcentage de réduction de l'œdème par l'extrait de <i>P.halepensis</i> et Diclofénac 75 mg.....	41
Figure 18 : pourcentage de réduction des crampes par l'extrait de <i>P. halepensis</i> Mill et Acépral.	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Position taxonomique de <i>Pinus halepensis</i>	5
Tableau II: La composition chimique des graines de <i>P. halepensis</i>	7
Tableau III: Principales espèces réactives oxygénées.....	8
Tableau IV: Localisation et fonction des antioxydants enzymatique et non enzymatique.....	10
Tableau V : Mode d'action anti-inflammatoire des flavonoïdes, acides phénoliques et des tanins.....	17
Tableau VI : Les différents traitements appliqués.....	27
Tableau VII : Poids d'extraits secs et rendement correspondant des deux extraits des composés phénoliques à partir des graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	32
Tableau VIII : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/ gE) et en flavonoïdes (mg EQ/ gE) des différents extraits.....	33
Tableau IX : le pouvoir antioxydant (exprimé par $IC_{50} \pm$ écart-type (en mg /ml)) des antioxydants de références et des extraits testés.....	36
Tableau X : Résultats du dosage des différents paramètres lipidiques (TC, TG, LDL et HDL) des groupes testés.....	38
Tableau XI : effet de l'extrait aqueux graines <i>P. halepensis</i> et le Diclofénac sur l'œdème de la patte induit par la carragénine.....	40
Tableau XII : effet antispasmodique de l'extrait aqueux des graines de <i>P. halepensis</i> Mill à 200 mg/ml et Acépral suite au test de torsion induit par l'acide acétique.....	43

SOMMAIRE

Liste des abreviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique

I. Les plantes médicinales	3
II. <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	3
II.1 Description botanique.....	3
II.2. Taxonomie et systématique.....	5
II.3. Répartition géographique	5
II.4. La composition chimique des graines de <i>P. halepensis</i>	6
II.5. Propriétés thérapeutiques.....	7
III. Les radicaux libres et le stress oxydant	8
III.1. les radicaux libres	8
III.1.2 Origine de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO)	8
III.2. Le stress oxydatif.....	9
III.2.1 Les conséquences biochimiques de stress oxydatif	9
IV. Les antioxydants	10
IV.1. Définition	10
V. l'hypercholestérolémie	11
V.1. Définition de l'hypercholestérolémie	11
V.2. L'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires	12
V.3. L'hypercholestérolémie et le stress oxydant	12
VI. Inflammation et anti-inflammatoires	13
VI.1. Généralités sur l'inflammation.....	13

VI.2. Anti-inflammatoire et leurs cibles pharmacologiques	15
VI.2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes	15
VI.2.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	15
VI.2.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	16

Matériels et Méthodes

I. Matériel.....	18
I.1. Matériel végétal	18
I.2. Matériel animal et conditions d'élevage	18
I.3. Réactifs et produits chimiques.....	19
II. Méthodes	19
II.1. Préparation de la poudre végétale	19
II.2. Identification botanique	19
II.3. Préparation de la poudre délipidée	19
II.4. Extraction des composés phénoliques.....	20
II.4.1. Préparation de l'extrait aqueux	20
II.4.1.1 Infusion.....	20
II.4.2. Préparation de l'extrait éthanolique	21
II.4.2.1 Macération	21
II.2.3. Evaluation des taux des composés phénoliques	23
II.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux	23
II.2.3.2 Dosage des flavonoïdes	24
II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	24
II.2.5 Evaluation de l'activité hypocholestérolémiant.....	26
II.2.6 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	27
II.2.7 Evaluation de l'activité antispasmodique (Analgésique).....	30

Résultats et Discussion

I. Rendement d'extraction	32
---------------------------------	----

II.Taux en phénols totaux et flavonoïdes	33
III.Evaluation de l'activité antioxydante	34
III.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	34
IV.Evaluation de l'activité hypocholestérolémiant.....	36
V.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	40
VI.Evaluation de l'activité antispasmodique	42
conclusion generale et perspectives	45

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents thérapeutiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants (**Belyagoubi, 2011**).

Parmi les plantes qui n'ont pas fait l'objet d'études détaillées, on trouve les graines de pin du genre *Pinus* qui produisent des graines comestibles et très nutritives. Le genre *Pinus* comprend environ 800 espèces dans le monde, principalement concentrées dans l'hémisphère nord (**Nergiz and İclalDönmez, 2004**). *Pinus halepensis* Mill a été largement planté dans le bassin méditerranéen occidental au cours de ce siècle, mais c'est en Afrique du Nord que semble actuellement avoir son centre de gravité, principalement en Algérie et en Tunisie où il constitue le massif le plus important en raison de sa résistance à la sécheresse (Maestrea et al., 2003). Les données expérimentales relatives aux propriétés bénéfiques des espèces de *Pinus* concernent principalement leurs activités anti-inflammatoires (**Rohdewald, 2002**), les antioxydants (**Guri et al., 2006; Vuorela et al., 2005**), liés à leurs effets sur l'activité de la cyclo-oxygénase (**Potta et al., 2005**).

Notre travail s'insère dans le cadre du programme destiné à la valorisation de la flore algérienne, par la recherche de nouveaux composés ou principes actifs à débouchés thérapeutiques. La sélection des espèces est basée essentiellement sur l'endémisme et l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle en vue d'une investigation phyto-chimique et biologique.

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

- Dans la première partie, nous avons commencé par une étude bibliographique qui est consacré à la description botanique de la plante et aux propriétés biologiques de *Pinus halepensis* Mill.
- La deuxième partie traitera la description du matériel et des méthodes utilisés, d'où nous nous sommes fixés plusieurs objectifs, à savoir :
 - ✚ l'étude phyto-chimique basée principalement sur la préparation des extraits aqueux et éthanoliques.

- ✚ la quantification des composés phénoliques et les flavonoïdes à partir des graines de *Pinus halepensis* Mill.

- ✚ l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits en utilisant la méthode DPPH.

- ✚ la détermination *in vivo* des activités biologiques : recherche de l'activité anti-inflammatoire et antispasmodique chez les souris, ainsi que l'effet d'extrait éthanolique sur le profil lipidique des rats sous un régime hypercholestérolémique.

Enfin, dans la troisième partie, nous avons rapporté les résultats obtenus entre autre les rendements, les teneurs des composés phénoliques et l'étude de différentes activités des extraits des graines de *Pinus halepensis* Mill.

Synthèse bibliographique

I. Les plantes médicinales

Depuis l' Antiquité, les plantes ont été la principale source de médicaments et toutes les sociétés humaines ont pratiquement utilisé les plantes non seulement comme sources de nutrition, mais aussi comme thérapie contre les maladies et les affections (**Wannes and Marzouk, 2016**).

Les plantes produisent, en plus des métabolites primaires, un grand nombre de métabolites secondaires qui ne sont pas issus lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures (**Mohammedi et al., 2013**). Ces composés peuvent jouer un rôle important dans la réduction des occurrences de nombreuses maladies en stimulant diverses fonctions des organes du corps humain (**Wannes and Marzouk, 2016**).

Il est par ailleurs reconnu que les plantes constituent une source importante de molécules bioactives qui présentent une large variété d'activités biologiques : antitumorale, antivirale, antimicrobienne et antioxydante (**Pothitirat et al., 2009**).

II. *Pinus halepensis* Mill

II.1 Description botanique

a. Genre *Pinus*

Le genre *Pinus* Appartient à la famille des pinacées (**Djerrad et al., 2015**).est divisé en trois sous-genres qui sont *Pinus*, *Ducampopinus* et *Cembrapinus*. Ces sous-genres sont divisés en section (**Guit, 2015**). Il comprend 800 espèces (**Kadri et al., 2015**) réparties dans le monde et essentiellement autour des côtes méditerranéennes.

Les pinacées sont des arbres conifères de 2 à 100 m de haut, leurs feuilles sont des aiguilles vertes, piquantes ou non, plus ou moins longues, attachées seules aux rameaux, ou réunies par 2 ou en rosettes (**Feikh, 2014**).

b. Espèce *pinus halepensis* Mill

Les pins du groupe "halepensis" représentent un capital forestier majeur sur le pourtour de la Méditerranée (**Quezel and Barbero, 1992**). Ils occupent environ 25 000 km² et dominent les types de forêts dans les régions semi-arides et sèches (**Kadri et al., 2015**).

Le Pin d'Alep est un arbre de taille moyenne de hauteur totale allant de 25 à 27 m. Sa longévité ne dépasse généralement pas 150 ans. Le Pin d'Alep a généralement un tronc tortueux, irrégulier et branchu. L'écorce des jeunes sujets est lisse et d'un gris argenté ; chez les adultes, elle forme un rhytidome plus ou moins gerçuré en écailles minces, larges et aplaties et de couleur rougeâtre. Les feuilles en aiguilles très fines, < 1 mm, molles, très

finement serrulées sur les bords, 5 à 10 cm de long ; réunies par deux, rarement par trois dans une gaine ; groupées en pinceaux à l'extrémité des rameaux ; couleur verte jaunâtre (**Nahal, 1962**). Les cônes sont ligneux à écailles dures, pédonculés, isolés ou par paires, ovoïdes-coniques à écusson proéminent et toujours longuement persistants, Ils mûrissent au cours de la deuxième année et laissent le plus souvent échapper leurs graines au cours de la troisième année. Le cône doit avoir subi de forte chaleur qui détruit les joints de résine entre les écailles pour pouvoir s'ouvrir. Ce dernier renferme des graines mates de 7 mm de taille (**Bellahouel, 2012**), à aile allongée et presque droite des deux côtés (**Nahal, 1962**).



Figure 01: photographies originales de l'arbre de *Pinus halepensis* (a), des aiguilles (b), des graines (c), des cônes (d).

II.2. Taxonomie et systématique

La taxonomie du pin d'Alep qui fut retenue par tous les botanistes est celle donnée par Miller en 1768 (*Pinus halepensis* Mill) (Smaïhi, 2009).

La taxonomie de *pinus halepensis* est la suivante :

Tableau I: Position taxonomique de *Pinus halepensis* (Feikh, 2014).

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Spermaphytes (Phanérogames)
Sous-embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	<i>Pinale</i>
Famille	<i>Pinacée</i>
Sous-famille	<i>Pinoïdée</i>
Genre	<i>Pinus</i>
Sous-genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis</i>

Noms usuels (Nahal, 1962) : Pin d'Alep, pin de Jérusalem, pin blanc (France).

Aleppo pine, Jerusalem pine (Angleterre).

Sanaouber halabi (pays arabes).

Noms vernaculaires : Azoumbei (Berbère).

Snouber (arabe).

Zkougou (la graine).

II.3. Répartition géographique

➤ *Dans le monde*

Pinus halepensis Mill. Occupe la zone la plus méridionale des pins méditerranéens (à l'exception de *P. Canariensis*) et il est très répandu dans la partie occidentale du bassin méditerranéen (Ghougali, 2011). Il s'étend de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) et du Moyen-Orient (Syrie, Liban, Jordanie, Palestine et Turquie) jusqu'à l'Europe méridionale méditerranéenne (Grèce orientale, Croatie, Italie du Nord, Est de la France et Espagne orientale (Djerrad et al., 2015). La couverture forestière totale est estimée à environ 3,5 millions d'hectares (Ghougali, 2011).



Figure 02 : La répartition de pin d'Alep dans le bassin méditerranéen (Fady et al., 2003).

➤ **En Algérie**

Le pin d'Alep occupe la première place de la surface forestière de l'Algérie, avec 35% de couverture. Il existe dans toutes les variantes bioclimatiques avec une prédominance dans l'étage semi-aride (Guit, 2015), sous la répartition suivante (Smaïhi, 2009):

- **A l'est** : il se trouve dans la région de Tébessa, les plateaux constantinois et les Aurès.
- **A l'ouest** : il marque bien sa présence à Bel Abbès, à Saida et dans l'Ouarsenis.
- **Dans la région d'Alger** : il constitue des peuplements assez importants de l'ouest à l'est. On peut citer les forêts de Médéa.
- **Dans l'atlas saharien** : il forme dans la région de Djelfa de beaux peuplements dans les Monts des Ouled-Nail.

II.4. La composition chimique des graines de *P. halepensis*

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de pin ont fait l'objet de plusieurs études phyto-chimiques dans le but d'identifier ses principes actifs. De nombreux travaux ont mis en évidence la richesse des extraits de ces graines en plusieurs constituants hétérogènes.

Les travaux de (Cheikh-Rouhou et al., 2006) ont montré que ces graines contiennent une multitude de composés chimiques (Tableau II).

Tableau II: La composition chimique des graines de *P. halepensis* (Cheikh-Rouhou et al., 2006).

Composition	Pourcentage %
Protéines	22.7%
Huiles	43.3%
Cendres	8.3%
Carbohydrates totaux	25.7%
Potassium, Magnésium et calcium	1%
Polyphénols totaux	3.71
Flavonoïdes	0.80
Acides gras insaturés :	
Acide oléique	27.3%
Acide linoléique	48.8%
Acides gras saturés :	
Acide palmitique	8.75%

II.5. Propriétés thérapeutiques

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

Les propriétés médicinales et aromatiques des composés chimiques (par exemple, la térébenthine, les résines et l'huile essentielle ...) de pin en font l'une des plantes les plus populaires dans toute la civilisation (Dob et al., 2005).

la térébenthine est une huile essentielle issue de *Pinus halepensis* (Ghanmi et al., 2007). Cette substance a une longue tradition d'utilisation réparatrice comme rubéfiant tonique pour le traitement des maladies rhumatismales (Šarac et al., 2014).

Cependant, les huiles essentielles des espèces de *Pinus* ont été signalées avoir une variété de propriétés thérapeutiques, les huiles d'aiguille de pin sont principalement utilisées en médecine populaire pour la guérison des infections respiratoires accompagnées de toux, de bronchite, d'asthme bronchique, d'emphysème, de trachéite, de sinusite, de laryngite, de pharyngite et de grippe (Šarac et al., 2014), tandis que l'extrait d'écorce de pin est utilisé dans les cosmétiques anti-âges (Šarac et al., 2014). En effet, l'huile de graine de pin a été signalée comme une source importante d'antioxydants naturels (Su, Wang, & Liu, 2009).

III. Les radicaux libres et le stress oxydant

III.1. les radicaux libres

Les radicaux libres (R°) sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe (**Tessier and Marconnet, 1995**). Ce sont des espèces chimiques, capables d'existence indépendante (**Goudable and Favier, 1997**). Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction d'oxydoréduction avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Ces substances sont très réactives et instables (**Mouhoubi-Tafinine et al., 2016**) possédant un temps de demi-vie extrêmement court (10^{-9} - 10^{-6} S) (**Tessier and Marconnet, 1995**). Les principales espèces réactives de l'oxygène sont représentées dans le tableau III.

Tableau III: Principales espèces réactives oxygénées (**Favier, 2003; Rolland, 2004**)

<i>Espèces réactives oxygénées (ERO)</i>	
Radicalaires	Non Radicalaires
$O_2^{\cdot-}$: anion superoxyde	1O_2 : oxygène singulet
OH^\cdot : radical hydroxyle	H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
HO_2^\cdot : radical prehydroxyle	$ROOH$: hydroperoxyde
RO^\cdot : Radical alkoxyde	$ONOO$: peroxyde nitrite
ROO^\cdot : radical peroxyde	
NO^\cdot : Radical oxynitrique	

III.1.2 Origine de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche and Hauswirth, 2006**). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- Des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (**Aurousseau, 2002**);
- des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (**Milane, 2004; Van Antwerpen, 2006**);
- du système xanthine déshydrogénase / oxydase activé lors d'ischémie-reperfusion (**Li and Jackson, 2002; Valko et al., 2004; Valko et al., 2006**)

- d'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement (**Tamer, 2003**).

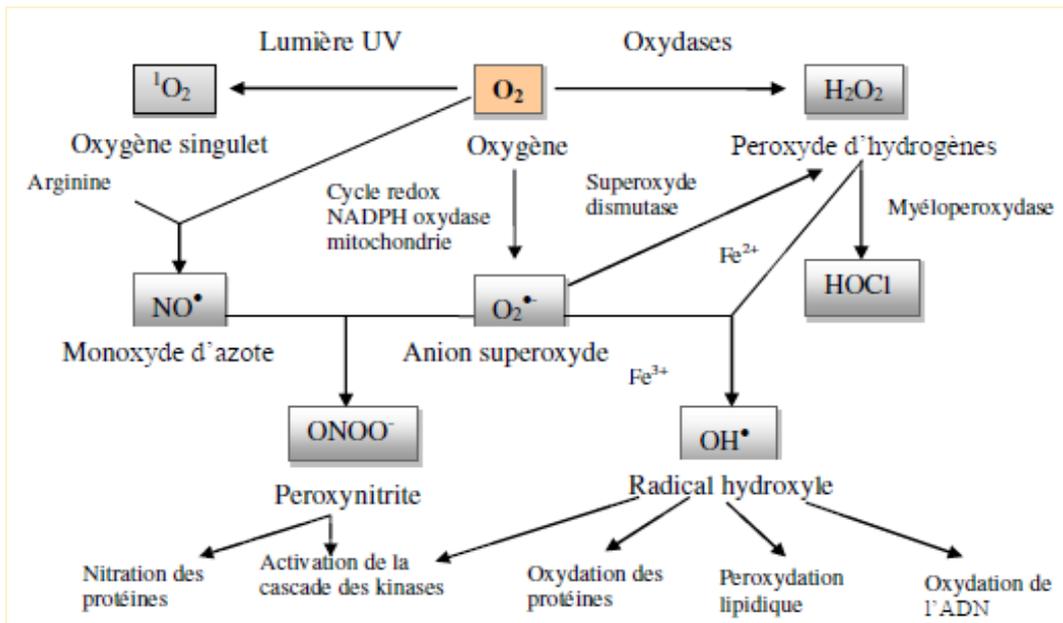


Figure 03 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués dans les oxydations biologiques (**Favier, 2003**).

III.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydant est un syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production des espèces oxygénées réactives (ERO). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines : déficit nutritionnel en antioxydant, surproduction endogène d'origine inflammatoire, exposition environnementale à des facteurs pro oxydants (**Favier, 1997**). Ceci est potentiellement associé à un risque accru de développer des pathologies liées au vieillissement tel que les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Haleng et al., 2007**).

Lors d'un stress oxydant, les ERO non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules directement à leur contact, contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (**Koehlin-Ramonatxo, 2006**).

III.2.1 Les conséquences biochimiques de stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation) et les protéines (**Gardès-Albert et al., 2003**). Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et

neurodégénératives, cancer, diabète...) et la dégradation des cellules et des tissus (**Bonnet et al., 2010**).

IV. Les antioxydants

IV.1. Définition

Les antioxydants (AO) sont des composés qui peuvent inhiber ou retarder l'oxydation des lipides et d'autres biomolécules. Ils interdisent le début d'une réaction en chaîne oxydante par des radicaux ou éteignent la propagation. Ces réactions peuvent causer des dommages fonctionnels au corps humain, comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Les antioxydants peuvent empêcher ce processus en raison de leurs propriétés redox comme le comportement réducteur, le don d'hydrogène ou l'extinction de l'oxygène singulet 1O_2 (**Wollinger et al., 2016**). Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Orban et al., 2011**). Selon le tableau suivant :

Tableau IV: Localisation et fonction des antioxydants enzymatique et non enzymatique.

Les antioxydants (AO)	Localisation et fonction
<i>Antioxydants enzymatiques</i>	
Super oxyde dismutase (SOD)	Il est localisé dans le cytoplasme, la mitochondrie et les milieux extra cellulaires. , Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en Oxygène (Landis and Tower, 2005).
Catalase (CAT)	Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (Valko et al., 2006). Elle permet de convertir deux molécules de H_2O_2 en H_2O et O_2 .
Glutathion peroxydase (GPx)	Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Valko et al., 2006).
<i>Antioxydants non enzymatiques</i>	

Vitamine E (tocophérol)	Elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisée par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (Pryor, 2000; Valko et al., 2006) .
Vitamine C (acide ascorbique)	Elle se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piéger directement l'anion super oxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH) l'oxygène singulier et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau, (Orban et al., 2011) .
Les caroténoïdes	Ils comportent de nombreux doubles liaisons conjuguées, au sein de leur structure, qui lui offre une activité antioxydante (Mortensen et al., 2001).
Les polyphénols	Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Vu leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions (Valko et al., 2006) .

V. L'hypercholestérolémie

V.1. Définition de l'hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie n'est pas une maladie, mais plutôt un des principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (MCV) **(De Peretti et al., 2014; Penumathsa et al., 2007)**. Chez l'homme, L'hypercholestérolémie est caractérisée par un taux élevé des teneurs sériques en cholestérol LDL (C-LDL)**(Sarazin, 1987)**. Elle apparaît lorsqu'il existe une insuffisance d'épuration hépatique du cholestérol sanguin ou une hyperproduction hépatique de cholestérol, ces deux circonstances sont associées. En effet, moins le foie capte du cholestérol et plus sa synthèse est accrue. La baisse de la captation hépatique de cholestérol est liée le plus souvent à une anomalie des récepteurs aux LDL (R-LDL) ou récepteur de l'apolipoprotéine (apo) B-100 et de l'apo E (R-apo B/E) caractérisée par une mutation au niveau du gène de structure du R-LDL que l'on regroupe en cinq catégories **(Robinson, 2013; Singh and Bittner, 2015)** :

- Défaut de synthèse du récepteur.
- Défaut de maturation et de transport du récepteur.

- Défaut de fixation (défaut de reconnaissance des lipoprotéines LDL).
- Défaut d'internalisation (mutation par délétion qui est responsable d'un défaut combiné de liaison d'internalisation, le produit de cette mutation est un récepteur tronqué, qui modifie son ancrage à la membrane et le rend impropre à la liaison aux LDL).
- Défaut de recyclage, c'est le cas de l'hypercholestérolémie familiale ou d'inhibition de la fonction des récepteurs.

V.2. L'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont des complications, le plus souvent tardives de l'athérosclérose, phénomène inflammatoire chronique. De nombreux facteurs de risques favorisent l'athérosclérose et les dyslipidémies en constituant un déterminant majeur. L'excès du C-LDL, fraction athérogène du cholestérol, est impliqué dans la pathogénicité de l'athérosclérose, et de ses complications cliniques (**Oguntibeju et al., 2009**).

Bien qu'il soit établi qu'une élévation anormale de la cholestérolémie augmente le risque cardiovasculaire, il apparaît aujourd'hui que le cholestérol ne présente pas la même potentialité athérogène selon qu'il soit véhiculé par les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les LDL ou les HDL. Les HDL exercent plutôt un effet bénéfique sur l'initiation de la plaque d'athérome (**Le et al., 2007**), alors qu'un taux élevé de LDL accroît le risque cardiovasculaire. Cette augmentation du risque s'explique à la fois par l'augmentation de la susceptibilité des LDL à l'oxydation, par leur plus forte affinité pour les protéoglycanes de la paroi artérielle et par leur plus faible affinité pour les récepteurs cellulaires (**Rosin, 2007**).

V.3. L'hypercholestérolémie et le stress oxydant

Un excès de cholestérol alimentaire est liée à une élévation précoce de la production des ERO, au niveau des érythrocytes et du foie d'une part, et à l'augmentation des marqueurs du stress oxydatif d'autre part, chez les sujets hypercholestérolémiques, provoquant une importante modification des LDL (**Nasar et al., 2009**).

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (**Haleng et al., 2007**).

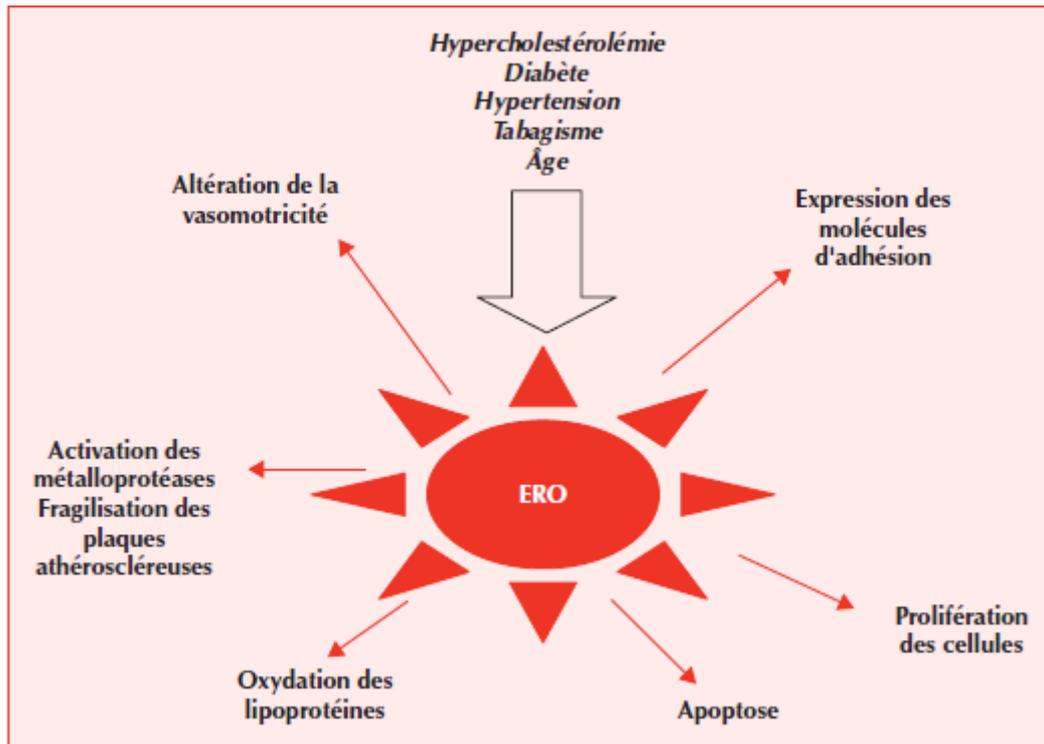


Figure 04 : Rôle des ERO (espèces réactives de l’oxygène) dans la formation de la plaque d’athérosclérose et relations avec les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (**Baudin, 2006**).

VI. Inflammation et anti-inflammatoires

VI.1. Généralités sur l’inflammation

L’inflammation est une réponse physiologique de défense face aux corps étrangers à l’organisme, qui comprend trois étapes (**Techer, 2013**).

Le processus inflammatoire débute le plus souvent par une phase vasculaire presque immédiatement après contact avec l’agent phlogistique et, caractérisé par l’augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant une vasodilatation prolongée (rougeur et gonflement). Cette vasodilatation est à la fois initiée et entretenue par des médiateurs chimiques comme l’histamine ou la sérotonine, libérée par des mastocytes et des polynucléaires (**Yvette, 2012**).

Puis, la phase cellulaire se caractérise par une infiltration leucocytaire. Une inflammation aiguë est caractérisée par l’expression et la sécrétion de médiateurs solubles, telles les cytokines. Ces dernières activent l’endothélium, la monocouche de cellules en contact du sang. Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë sont toujours les mêmes quels que soient le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé: roulement, adhésion et transmigration des leucocytes à travers l’endothélium (**Vasson and Reimund, 2007**) (**Figure 05**).

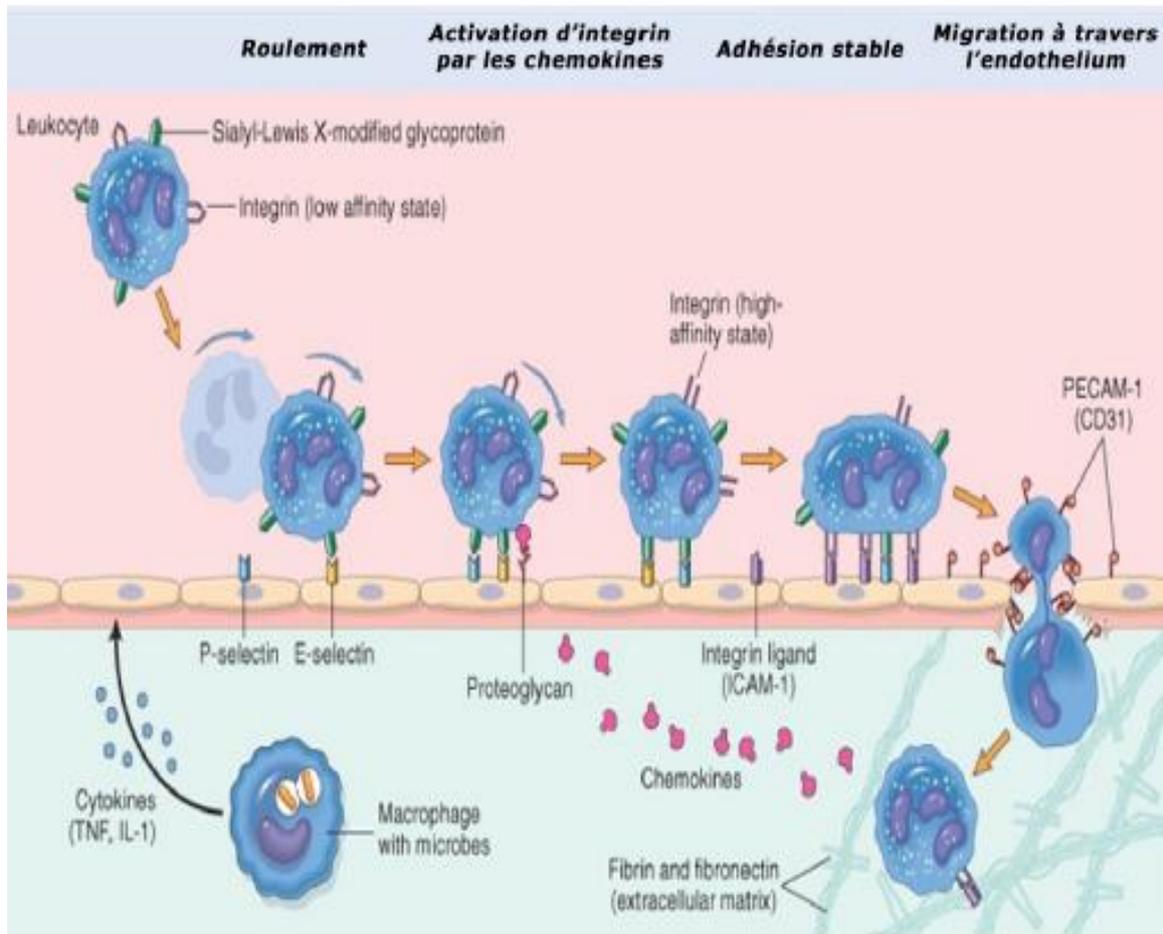


Figure 05: Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins(Kumar et al., 2017).

L'inflammation est donc habituellement un processus bénéfique. Néanmoins, sous certaines conditions, elle peut s'avérer néfaste. L'agressivité de l'agent pathogène, sa persistance, le siège de l'inflammation ou encore les régulations anormales du processus inflammatoire peuvent engendrer une évolution vers une inflammation chronique (Techer, 2013).

Le déclenchement et le maintien de l'inflammation, ainsi que sa diffusion au niveau du foyer initial font appel à plusieurs médiateurs (Cavaillon, 2005):

- **Les amines (histamines et sérotonine):** Libérées par les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes. Elles provoquent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire.
- **Les prostaglandines et leucotriènes :** Sont l'origine de la vasodilatation, de la douleur et de l'attraction locale des polynucléaires et de la fièvre.

- **Les molécules d'adhérence** : Permettent le ciblage du foyer inflammatoire par les cellules immunitaires.
- **Les cytokines** : Elles sont produites par les lymphocytes T et les macrophages. Elles agissent sur des récepteurs membranaires de manière autocrine (de la cellule productrice), paracrine (cellule proche) ou endocrine (cellule à distance). Elles peuvent être pro-inflammatoires (interleukine (IL) : IL-1 β , IL-6, ou le TNF α) ou encore anti-inflammatoires (IL-10).

VI.2. Anti-inflammatoire et leurs cibles pharmacologiques

VI.2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont de puissants agents anti-inflammatoires, aux points d'impact multiples sur les différentes étapes et mécanismes, Il est tentant de les utiliser en thérapeutique et sont synthétisés sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien adrénérgique. Le principal mécanisme d'action des glucocorticoïdes repose sur leur liaison avec leur récepteur (GR), ils sont exercés surtout des effets inhibiteurs qui limitent l'action des principaux médiateurs de la réponse inflammatoire, l'inhibition surtout de la synthèse de l'IL-1, de l'IL-6, et un moindre degré du TNF α , réduction de production des prostaglandines et des leucotriènes, l'inhibition des facteurs chimiotactiques et baisse l'expression des molécules d'adhérence et limitation des processus de vaso-perméabilité. Cependant leurs effets secondaires peuvent être importants, sont liés à l'utilisation prolongée ou l'augmentation de la posologie induisant à des divers troubles (ulcères gastriques, l'hypertension, l'hyperglycémie...) (**Nicolaidis et al., 2010**).

VI.2.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens regroupent un ensemble de molécules présentant des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Leurs efficacités comme leurs principaux effets secondaires sont liés à leur mécanisme d'action principale qui est l'inhibition des cyclo-oxygénases, enzymes responsables de la synthèse des prostaglandines et du thromboxane. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques, c'est à-dire non sélectifs, inhibent les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens sélectifs de la COX-2 (coxib). Ces derniers sont supposés avoir moins d'effets secondaires (**Figure 06**) (**Bacchi et al., 2012**).

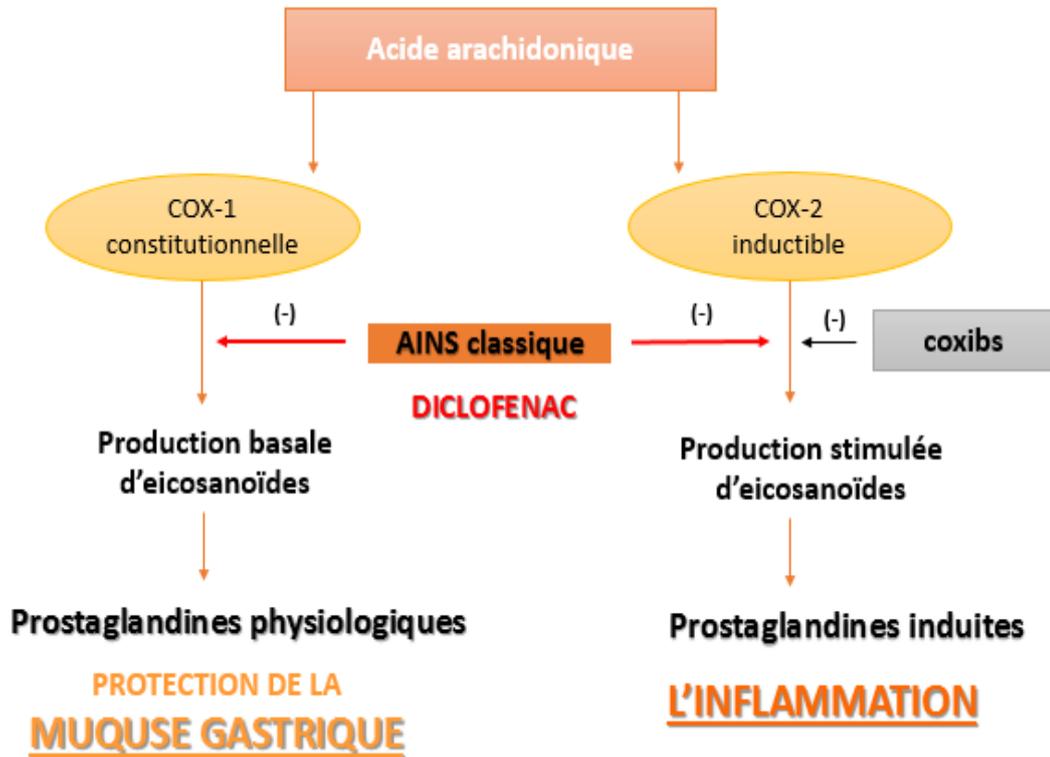


Figure 06 : Modulation pharmacologique des isoenzymes de la cyclo-oxygénase (Jouzeau et al., 2004).

VI.2.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes médicinales ont longtemps été utilisées dans la médecine traditionnelle contre diverses inflammations. Il a été montré que cet effet est dû aux métabolites secondaires qui existent dans ces plantes et qui ont plusieurs effets thérapeutiques (Parvin et al., 2015). De nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissent comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation (Gonzalez-Gallego et al., 2010). Le (tableau III) résume les mécanismes d'action des flavonoïdes, des acides phénoliques et des tanins, principaux polyphénols ayant une activité anti-inflammatoire.

Tableau V : Mode d'action anti-inflammatoire des flavonoïdes, acides phénoliques et des tanins
(Agrawal, 2011; Kim et al., 1996; 2004; Mota et al., 1985; Wen et al., 2012).

Les flavonoïdes	Les acides phénoliques	Les tannins
<ul style="list-style-type: none">➤ Inhibition des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'AA.➤ limiter la dégranulation des neutrophiles.➤ Inhibition de facteur de transcription NFκB en inhibant la phosphorylation de son inhibiteur IK B par une IK B kinase.	<ul style="list-style-type: none">➤ Inhiber l'expression de LOX.➤ Réduction du nombre des leucocytes qui migrent au foyer inflammatoire.➤ L'acide caféique réduit le taux d'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) et de protéines (iNOS), COX-2 et de TNF-α par inhibition du facteur NFκB.	<ul style="list-style-type: none">➤ Inhibition de la libération et migration de cytokines et des leucocytes par formation de complexes avec les macromolécules, les agréger et donc les rendre inactives.➤ Réparation des tissus par leur propriété cicatrisante.

Les alcaloïdes et les terpénoïdes exercent aussi un effet anti-inflammatoire par la diminution de la perméabilité vasculaire et donc le recrutement des leucocytes en inhibant NO, leucotriène, PGE2 et COX (Franchomme, 2015; Huang, 2014; Lopes Souto et al., 2011).

Matériels et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La partie expérimentale de ce travail est portée sur les graines de pin d'Alep « *Pinus halepensis* Mill. », qui ont été achetées chez un herboriste de la ville de Tazmalt.

I.2. Matériel animal et conditions d'élevage

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles, *Swiss albinos* dont le poids varie entre 17 et 22 g pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire et antispasmodique, et des rats mâles *Wistar albinos*, qui pèsent entre 140 et 200 g pour l'activité hypocholestérolémiante. Ils ont été procurés du Centre de Recherche et de Développement (CRD) SAIDAL-Alger. Les animaux ont été hébergés dans des cages de polypropylène dans des conditions d'éclairage normales (12 h de lumière / 12 h d'obscurité). Les locaux sont dotés d'une climatisation dynamique avec une température de (20-24°C), avec un taux d'humidité (50 ± 10 %). Ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard.



Figure 07: Photographie du lieu d'élevage des souris et des rats (originale).

I.3. Réactifs et produits chimiques

Les solvants organiques utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont de grade analytique (le méthanol, l'éthanol, le chloroforme) ont été fournis par *Prolabo*.

Les différents acides sont : l'acide acétique ($C_2H_4O_2$), l'acide ascorbique du *Biochem* et l'acide gallique de *Sigma*.

Les réactifs chimiques sont le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) et le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) ont été fournis par *Sigma-Aldrich*, le Folin-Ciocalteu (FCR) par *Biochem*.

Les sels sont : Bicarbonate de sodium ($NaCO_3$) de *Sigma*. D'autres produits chimiques utilisés : la carragénine et la quercétine par *Sigma-Aldrich*.

II. Méthodes

II.1. Préparation de la poudre végétale

Les graines de *Pinus halepensis* Mill, une fois nettoyées et débarrassées de poussières sont alors séchées dans l'étuve. Les graines séchées sont directement broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine. La poudre ainsi obtenue est entreposée dans un récipient hermétique.

II.2. Identification botanique

L'espèce a été identifiée dans la salle herbier de département botanique, École nationale supérieure agronomique d'Alger (ENSA).

II.3. Préparation de la poudre délipidée

Pour préparer l'extrait, nous avons d'abord procédé à une délipidation des graines de *Pinu shalepensis* Mill. préalablement broyées selon le protocole de (**Kadri et al., 2013**). La poudre a été délipidée à l'aide d'un soxhlet en utilisant un mélange de solvants de chloroforme / méthanol (2 :1, v/v). La poudre délipidée a été récupérée et laissée sous hôte afin d'aspirer totalement le mélange de solvants.



Figure 08 : Montage soxhlet.

II.4. Extraction des composés phénoliques

II.4.1. Préparation de l'extrait aqueux

II.4.1.1 Infusion

L'infusion est un procédé simple et rapide qui permet une bonne extraction des principes actifs, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de la plante fraîche ou séchée et le bien tromper pour dissoudre des principes actifs. Elle convient pour l'extraction des parties fragiles des plantes : feuilles, fleurs, graines, écorces et racines (Konkon et al., 2006).

➤ *Protocole expérimentale*

Le protocole a été décrit par (Cheurfa and Allem, 2015) en y apportant quelques modifications. Un volume de 100 ml d'eau bouillante a été versé sur 10 g de poudre de graines délipidée de *P. halepensis* Mill dans un récipient en verre recouvert. Après 15 minutes de contact, l'extrait aqueux a été récupéré par filtration sur papier Wattman N° 1. Le filtrat obtenu a été concentré au Rotavapeur à la température de 40 °C.

II.4.2. Préparation de l'extrait éthanolique

II.4.2.1 Macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante (**Feknous et al., 2014**).

➤ *Protocole expérimentale*

Le protocole a été décrit par (**Mohammedi, 2011**) en y apportant quelques modifications. Une masse de 20 g de poudre délipidée ont été macérés à température ambiante pendant 48 h avec 200 ml d'éthanol (70%). Après filtration à travers du papier Whatman N° 1, le filtrat obtenu a été soumis à une évaporation sous vide à 40°C pour éliminer l'éthanol. Le rendement d'extraction a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\mathbf{R (\%)} = (M_1 - M_0 / M) \times 100$$

Avec : **R (%)** : Rendement en %.

M₀ : Masse du bécher vide.

M₁ : Masse du bécher après évaporation.

M : Masse de matière sèche.

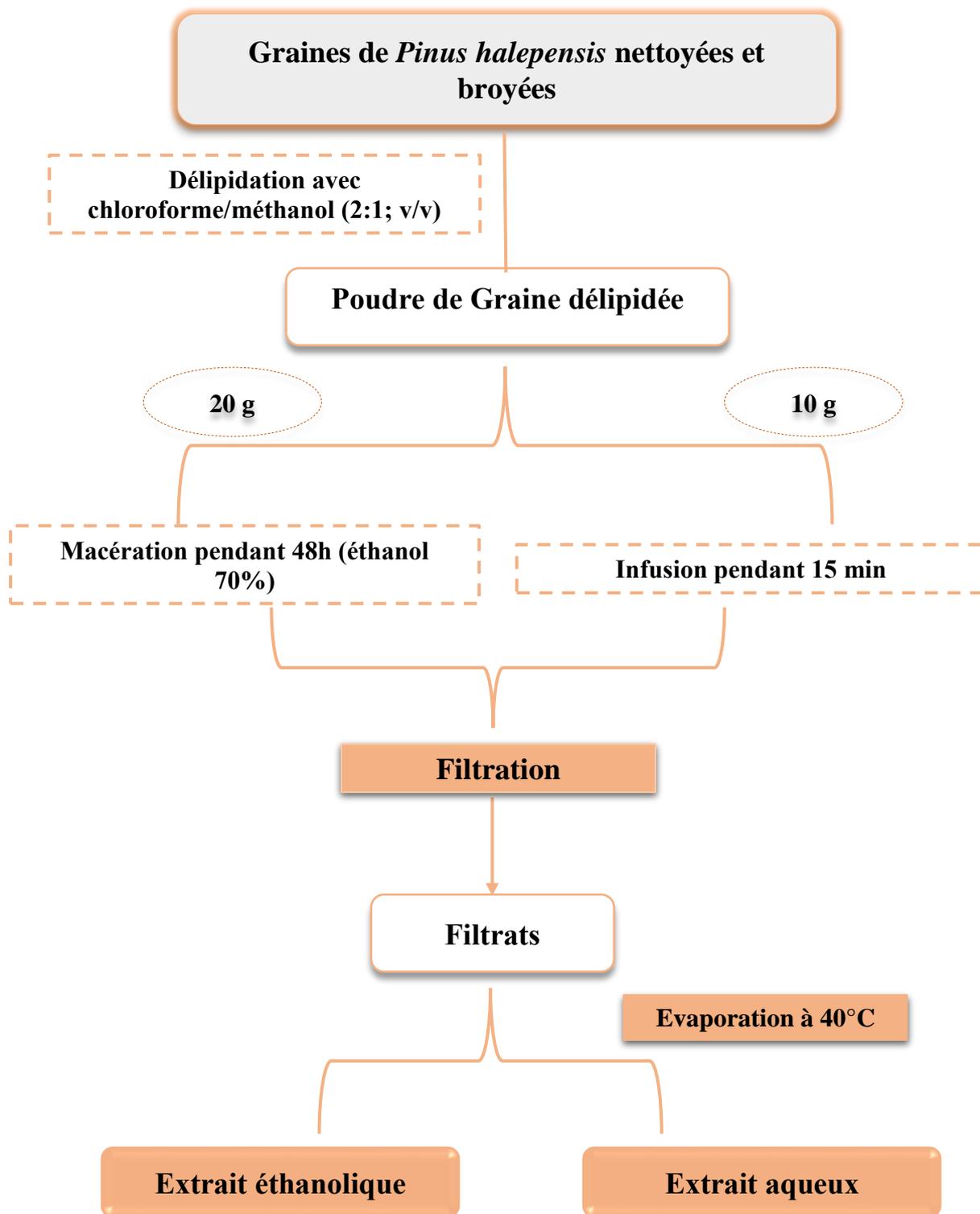


Figure 09 : Etapes d'extraction des composés phénoliques des graines de *Pinus halepensis* Mill.

II.2.3. Evaluation des taux des composés phénoliques

II.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux

➤ *Principe*

Le réactif de folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits obtenus (**Boizot and Charpentier, 2006**).

Les polyphénols totaux des extraits ont été déterminés par utilisation de la méthode de Follin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme standard (**Singleton and Rossi, 1965**).

➤ *Mode opératoire*

Un volume de 5 ml d'eau distillée a été ajouté à 200 μ l de chaque extrait (préparé avec des dilutions convenables), après agitation, 1 ml de la solution de Folin-Ciocalteu (dilué dix fois dans l'eau distillée) a été ajouté à l'ensemble et laissé reposer 3 min, puis 0,8 ml de la solution de carbonate de sodium à 10% ont été additionnés. après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été lue à 765nm (**Kähkönen et al., 1999**).

Le taux des polyphénols dans les extraits des graines de *P. halepensis* Mill, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique comme standard de référence (**Annexe 01**). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme (mg EAG / g d'extrait) (**Talbi et al., 2015**).

La quantité des phénols totaux a été calculée par l'équation suivante :

$$C = c \cdot v / m$$

Avec : **C** = contenu totale des phénols (mg EAG / g d'extrait).

c = concentration des extraits EAG, obtenu à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

v = volume de l'extrait (ml).

m = masse de l'extrait pur de la plante (g).

L'expérience a été faite en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type.

II.2.3.2 Dosage des flavonoïdes

➤ *Principe*

La méthode colorimétrique de dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dans l'absorption maximale et la longueur d'onde à 415 nm, contre un témoin (**Djeridane et al., 2006**).

➤ *Mode opératoire*

Un volume de 1 ml d'une solution éthanolique d' AlCl_3 (2%) a été ajouté à 1ml d'échantillon. Après 1 h d'incubation à la température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 420 nm (**Wu et al., 2009**). Une courbe d'étalonnage établie par la quercétine (**Annexe 02**), servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur totale en flavonoïdes des extraits de plantes a été exprimée en milligrammes équivalent de quercétine par gramme de poudre de plante (mg Eq Q/ g).

L'expérience a été faite en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type.

II.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des composés phénoliques a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

➤ *Principe du test DPPH*

Le Diphényle picryl-hydrazyle (DPPH), est un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (**Sanchez-Moreno, 2002**).

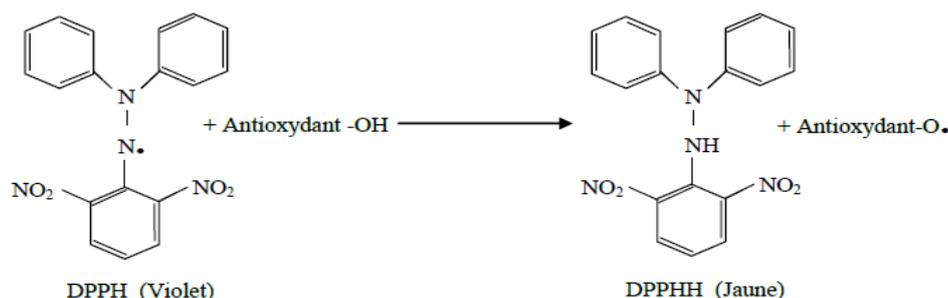


Figure 10 : Mécanisme réactionnel d'un antioxydant avec le DPPH (Popovici et al., 2009).

➤ *Mode opératoire*

Pour la mesure de l'activité antioxydante, nous avons suivi le protocole décrit par (Talbi et al., 2015) en y apportant quelques modifications. 200 µl de chacune des différentes concentrations des extraits polyphénoliques (0,16 ; 0,8 ; 4 ; 20 ; 100 mg/ml) ont été ajoutés à 2600 µl d'une solution éthanolique de DPPH (0,004%). Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre le blanc. Le contrôle positif a été représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que l'échantillon. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH a été calculé par la formule suivante :

$$I (\%) = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}} / A_{\text{contrôle}}) \times 100$$

Avec : $A_{\text{contrôle}}$: Absorbance de la solution DPPH seule.

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon.

La valeur de la concentration inhibitrice IC₅₀ représente la concentration d'extraits qui neutralise 50% des radicaux de DPPH. L'IC₅₀ utilisée comme une estimation de l'activité antioxydante par DPPH a été calculé à partir de la courbe de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations de l'extrait. La valeur d'IC₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. Cette valeur est exprimée en mg. ml⁻¹ (Boubekri, 2014).

Pour chaque composé, les résultats sont la moyenne de 3 expériences menées en parallèle.

II.2.5 Evaluation de l'activité hypocholestérolémiante

L'activité hypocholestérolémiante de l'extrait éthanolique a été évaluée par la détermination du profil lipidique des rats sous un régime hypercholestérolémique (**Khera and Bhatia, 2012**).

Notre expérience a été réalisée sur 15 rats mâles du type *Wistar Albinos* âgés de 10 à 12 semaines et pesant entre 140 et 200 g.

➤ **Mode opératoire**

L'effet anti-hypocholestérolémiant des graines de *P. halepensis* Mill. a été mené selon le protocole de (**Gulcan et al., 2006**) avec quelques modifications.

L'hypercholestérolémie a été induite par un régime riche en cholestérol (aliment standard de granulés supplémenté avec 0,5 % du cholestérol, 10 % de graisses du mouton et 1 % d'huile de tournesol). Tous les rats avaient un accès libre à la nourriture et à l'eau *ad libitum* pendant la période d'expérimentation. Après 15 jours du régime, les rats développent une hypercholestérolémie. Le plan expérimental comporte trois groupes de 5 rats chacun comme suivant :

Groupe I (groupe contrôle normal) : les rats reçoivent un régime alimentaire standard de granulés (**Annexe 03**).

Groupe II (groupe contrôle hypercholestérolémique) : les rats sont alimentés avec un régime riche en cholestérol pendant toute la période d'expérimentation (30 jours).

Groupe III (groupe traité) : les rats hypercholestérolémiques reçoivent chaque jour par voie orale 2 ml d'extrait éthanolique à une concentration de 100 mg/ml pendant 15 jours.

Au bout de 30 jours d'expérimentation, après 24 h de jeûne, les rats de tous les groupes ont été anesthésiés par l'éther di-éthylique pur et leur sang a été collecté dans des tubes contenant de l'héparine lithium. Les échantillons du sang ont été immédiatement centrifugés pendant 10 min, le plasma a été récupéré et conservé à (- 20C°) pour le dosage des paramètres lipidiques suivants : total cholestérol (TC), triglycérides (TG), lipoprotéines de basse densité (LDL) et lipoprotéine de haute densité (HDL) (**Annexe 04**).

II.2.6 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

➤ *Principe*

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

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondante (Levy, 1969).

➤ *Mode opératoire*

Le test consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux sur l'œdème de pattes postérieures après injection de la carragénine à 0,1 % sous l'aponévrose plantaire chez les souris selon le test de (Levy, 1969).

Les souris ont été réparties en 4 lots de 6 souris, dont le poids corporel est compris entre 17 et 22 g. Ces souris ont été mises à jeun la veille du test.

La préparation des solutions administrées est illustrée en (Annexe 05).

- **Au temps T₀** : Les souris des quatre lots sont traitées comme suit (Tableau VI) :

Tableau VI : Les différents traitements appliqués.

Lots	Traitements
Lot de témoin	Chaque souris reçoit par gavage 0,5 ml d'Eau distillée.
Lot essai N° 1	Chaque souris reçoit par gavage 0,5 ml de l'extrait aqueux à une concentration de 100 mg/ml.
Lot essai N° 2	Chaque souris reçoit par gavage 0,5 ml de l'extrait aqueux à une concentration de 200 mg/ml.
Lot de référence	Chaque souris reçoit par gavage 0,5 ml du produit de référence (Diclofénac 75 mg) à une concentration de 5 mg/ml

- **Au temps T₀ + 30 min** : la solution de carragénine (0,1%) a été injectée sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche à un volume de 0,025 ml pour toutes les souris.

- **Au temps T₀ + 4h** : le sacrifice des souris a été faite par une dislocation cervicale, puis les pattes gauches et droites ont été coupées à hauteur de l'articulation et pesées sur une balance analytique.

➤ **Expression des résultats**

L'activité anti-inflammatoire est exprimée en variation de moyenne de poids de la patte droite et la patte gauche pour chaque lot et en pourcentage d'augmentation de l'œdème pour chaque groupe qui est calculé par la formule suivante (**Colot, 1972**) :

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

Avec : **mg** : moyenne des pattes gauches.

md : moyenne des pattes droites.

Et aussi en pourcentage de réduction de l'œdème qui est calculé chez les souris traitées par rapport au témoin.

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

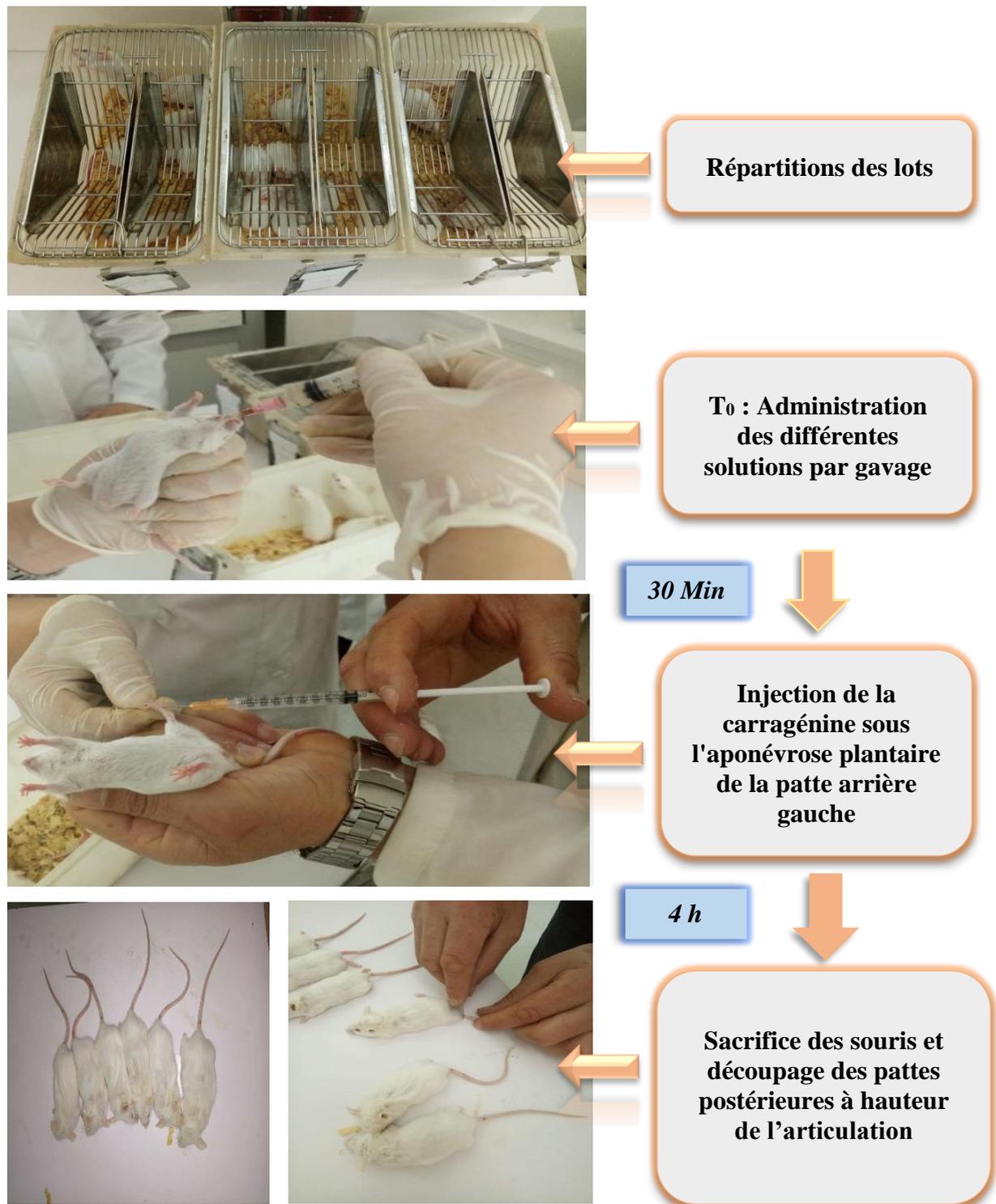


Figure 11 : Protocole expérimentale de l'activité anti-inflammatoire.

II.2.7 Evaluation de l'activité antispasmodique (Analgésique)

L'activité antispasmodique de l'extrait aqueux des graines de *Pinus halepensis* Mill a été évaluée suivant le protocole adopté par le centre de recherche et de développement (CRD) SAIDAL-Alger selon la méthode décrite par (Vogel and Vogel, 1997).

➤ *Principe*

L'injection de l'acide acétique par voie intra-péritonéale chez les souris provoque une réaction douloureuse. Cette douleur se manifeste par des mouvements de torsion de l'abdomen, avec étirement des pattes postérieures (crampes), qui peut être réduite par un produit antalgique. Cette étude permet de comparer la réduction du nombre de crampes après administration de doses égales du produit antalgique et du produit de référence correspondante.

➤ *Mode opératoire*

Les souris ont été réparties en 3 lots de 6 souris, dont le poids corporel est compris entre 17 et 22 g. Ces souris ont été mises à jeun la veille du test.

- **A Temps T₀** : Les souris des 3 lots ont été traitées comme suit :

Lot témoin : les souris de ce lot reçoivent par gavage 1 ml d'eau physiologique.

Lot essai : les souris de ce lot reçoivent par gavage 1 ml de l'extrait aqueux à une concentration de 200 mg/ml.

Lot référence : les souris de ce lot reçoivent 1ml du produit de référence (Acépral) à une concentration de 50 mg/ml.

- **A temps T₀ + 30min** : chaque souris des différents lots reçoit par voie intra-péritonéale 0,2 ml de l'acide acétique (1%).



Figure 12 : Photographie d'une injection intra-péritonéale (originale).

- **A temps T0+ 35min** : après 5 min de l'injection de l'acide acétique, les crampes ont été comptabilisées pendant un laps de temps de 10 minutes.

➤ **Expression des résultats**

L'activité antispasmodique de l'extrait aqueux est estimée par la détermination du pourcentage de réduction des crampes (pourcentage de protection), calculé suivant la formule.

$$\% \text{ de réduction des crampes} = (\text{Mc du lot témoin} - \text{Mc du lot essai}) / \text{Mc du lot témoin} \times 100$$

Avec : **Mc** : moyennes des crampes.

Résultats et Discussion

I. Rendement d'extraction

Dans cette étude, le rendement (l'extrait sec, obtenu après évaporation, contenant les composés phénoliques) a été déterminé par rapport à 10 g de la matière végétale pour l'extrait aqueux et 20 g pour l'extrait éthanolique.

Le poids de l'extrait sec a été déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

Les résultats de cette manipulation sont représentés dans le **tableau VII**.

Tableau VII : Poids d'extraits secs et rendement correspondant des deux extraits des composés phénoliques à partir des graines de *Pinus halepensis* Mill.

Extraits	Poids d'extrait sec (g)	Rendement (%)
Aqueux	0,155	15,5
Ethanolique	0,092	9,2

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, du **tableau VII** que l'eau donne le meilleur rendement d'extraction soit un pourcentage de 15,5 %, alors que l'éthanol donne le plus faible rendement (9,2 %).

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale. Il dépend de plusieurs paramètres tels que : le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon (**Do et al., 2013**).

D'après **Bruneton (1999)**, la variation des résultats d'un extrait à l'autre est due principalement aux solvants d'extraction utilisés, dont les solvants polaires montrent un meilleur rendement d'extraction par rapport aux solvants moins polaires. La différence de polarité des solvants utilisés permet l'extraction d'une large gamme de métabolites secondaires (**Green, 2004**).

Il y a également une autre raison qui pourrait avoir un impact sur le rendement d'extraction, c'est le temps d'extraction qui est généralement très long dans le cas de la première méthode (48 heures) par rapport à la deuxième méthode (15 min). Selon **Rhazi et al. (2015)**, la progression de temps d'extraction peut diminuer le rendement de l'extrait et cela peut être dû à la dégradation de certaines substances naturelles comme les polyphénols.

II. Taux en phénols totaux et flavonoïdes

La teneur en phénols totaux et flavonoïdes est déterminées à partir des courbes d'étalonnage ($y = 2,3214x + 0,0349$, $R^2 = 0,9987$) (**annexe 01**) et ($y = 35,927x + 0,0015$, $R^2 = 0,9998$) (**annexe 02**) tracées en utilisant comme standard l'acide gallique et la quercétine, respectivement. Les concentrations sont exprimées en mg EAG/ g E pour les phénols totaux et en mg EQ/ g E pour les flavonoïdes.

Les résultats de la teneur en phénols totaux et flavonoïdes sont illustrés dans le **tableau VIII** et représenté dans la **figure 13**.

Tableau VIII : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/ gE) et en flavonoïdes (mg EQ/ gE) des différents extraits.

Extraits	Polyphénols totaux (mg EAG/ g E)	Flavonoïdes (mg EQ/ g E)
Extrait éthanolique	4,02 ± 0,00	0,27 ± 0,001
Extrait aqueux	0,14 ± 0,001	0,13 ± 0,00

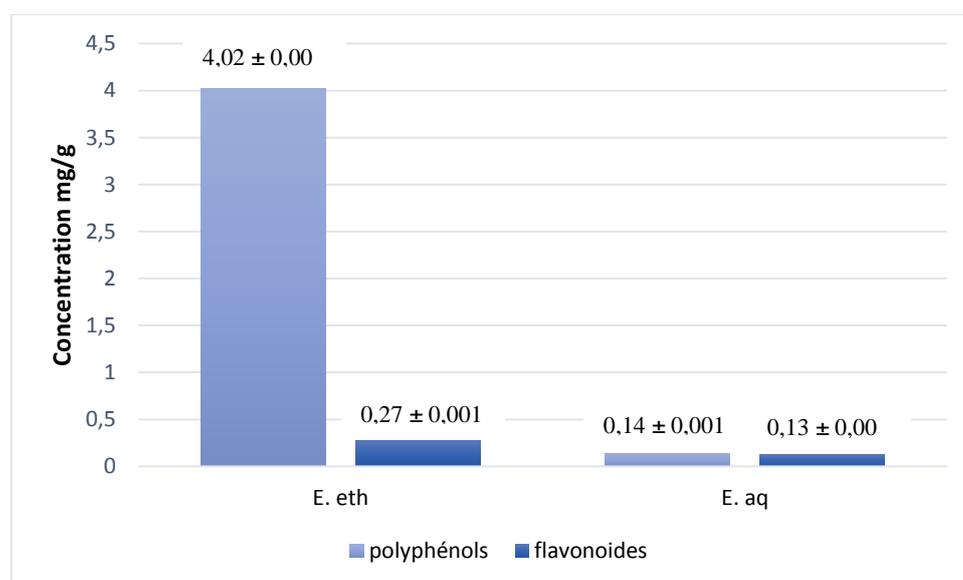


Figure 13: Teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits éthanolique et aqueux.

Les résultats montrent que l'extrait éthanolique du *P. halepensis* Mill possède une teneur plus élevée en polyphénols totaux qui est de l'ordre de $4,02 \pm 0,00$ mg EAG/ g E. La teneur en flavonoïdes enregistrée quant à elle est égale à $0,27 \pm 0,001$ mg EQ/ g E.

Pour l'extrait aqueux, les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes observées dans les graines égalent à $0,14 \pm 0,001$ mg EAG/ g E et $0,13 \pm 0,00$ mg EQ/ g E respectivement. Ces valeurs sont faibles par rapport à celles trouvées dans l'extrait éthanolique.

A partir de ces données, on peut déduire que les polyphénols représentent la fraction majoritaire par rapport aux flavonoïdes dans l'extrait éthanolique, alors qu'on trouve les mêmes teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans l'extrait aqueux.

Selon l'étude menée par **Kadri et al. (2014)** faite sur les graines de *P. halepensis* Mill, les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes trouvées dans l'extrait méthanolique (50%) sont de 3,71 mg EAG/ g E et 0,80 mg EQ/ g E respectivement. Ces valeurs sont différentes de celles obtenues avec cette étude. Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, la localisation géographique (**Ryan et al., 1999**), les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante, la température et le solvant d'extraction (**Conde et al., 2009**).

III. Evaluation de l'activité antioxydante

III.1. Le test de piégeage du radical DPPH

La méthode du DPPH est indépendante de la polarité du substrat. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée. Les graphes ci-dessous représentent la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait.

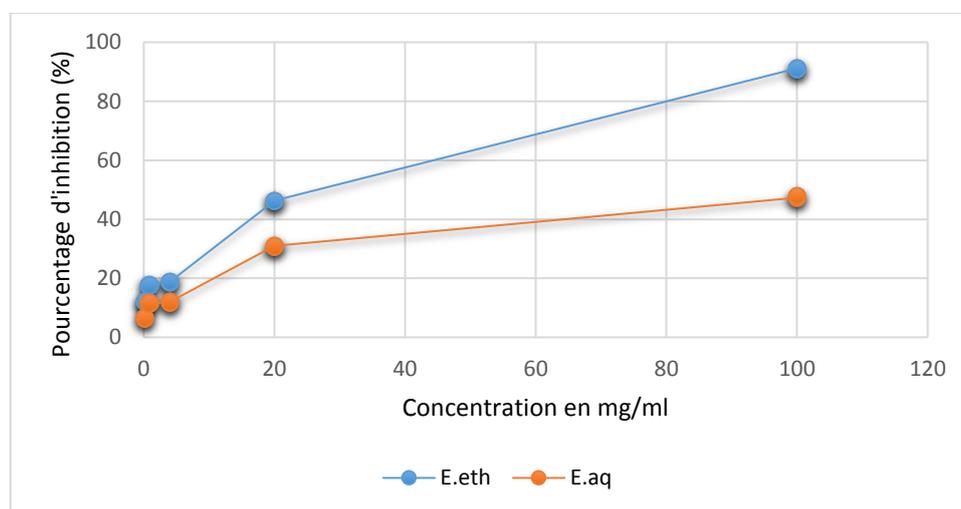


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux.

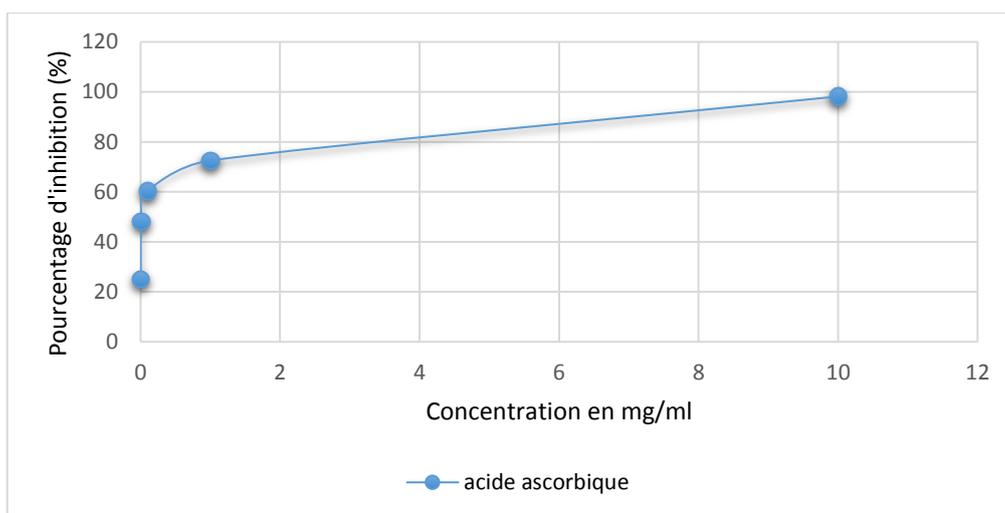


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.

D'après les résultats représentés dans les **figures (14, 15)**, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration que soit pour le standard (l'acide ascorbique) ou pour les différents extraits de la plante.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour les extraits était inférieur à celui du standard pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 10 mg/ml, le standard (acide ascorbique) a révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de $98,17\% \pm 0,7$. Concernant les deux extraits, pour une concentration de 100 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de DPPH est de $91,13\% \pm 0,03$ pour l'extrait éthanolique tandis que l'extrait aqueux est de $47,66\% \pm 0,47$. Ces pourcentages correspondent à une inhibition totale du DPPH reflétée par la décoloration complète du DPPH du violet en jaune pâle.

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir de l'IC₅₀, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (**Locatelli et al., 2009**).

Nous avons déterminé pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH ou IC₅₀. À partir des équations des régressions linéaires des graphes.

Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau IX : le pouvoir antioxydant (exprimé par $IC_{50} \pm$ écart-type (en mg /ml)) des antioxydants de références et des extraits testés.

	IC50 Moy \pm Et (mg/ml)
Extrait éthanolique	42,02 \pm 0,042
Extrait aqueux	100,75 \pm 0,875
Acide ascorbique	0,074 \pm 0,01

D'après les résultats présentés dans le **tableau IX**, l' IC_{50} obtenu pour l'acide ascorbique ($0,074 \pm 0,01$ mg /ml) utilisé comme une molécule de référence, est bien plus inférieur à ceux des extraits et donc, une activité antioxydante très élevée. L'extrait éthanolique présente une IC_{50} (de l'ordre de $42,49 \pm 0,042$ mg /ml) largement inférieur à celle de l'extrait aqueux ($100,75 \pm 0,875$ mg /ml).

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Bougandoura and Bendimerad, 2012). Les polyphénols contenus dans nos extraits sont probablement responsables de l'activité antioxydante d'autant plus que l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique trouvé est toujours supérieure que celle de l'extrait aqueux (Fabienne, 2013).

Il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé du groupement hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Heim et al., 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (Torres De Pinedo et al., 2007), ce qui peut expliquer en partie que l'activité anti-radicalaire soit dépendante du nombre, de la position et le degré de polymérisation (Popovici et al., 2009). Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (De Quirós et al., 2010).

IV. Evaluation de l'activité hypocholestérolémiante

Dans la présente étude, les graines de *P. halepensis* Mill ont été sélectionnées pour être évaluées pour leur activité hypocholestérolémiante *in vivo*. Des effets inhibiteurs sur l'hypercholestérolémie d'un extrait éthanolique ont été examinés chez les rats.

L'hypercholestérolémie augmente le risque de développement de l'athérosclérose et l'apparition des maladies cardiovasculaires. Elle est due à la fois à la teneur en cholestérol apportée par l'alimentation et par sa synthèse au niveau du foie (Noyan, 1996).

Dans la présente étude, chez les rats du groupe contrôle hypercholestérolémique, le régime riche en cholestérol (0,5 %) provoque une augmentation importante des concentrations sériques du TC ($85,16 \pm 11,16$ mg/dl) ; TG ($136 \pm 34,01$ mg/dl) ; LDL ($49,5 \pm 6,18$ mg/dl) et une diminution de la concentration de HDL ($8,1 \pm 0,71$ mg/dl), par rapport au groupe contrôle normal qui a reçu une alimentation normale et dont les concentrations respectives sont de $50,16 \pm 1,60$; $60 \pm 3,34$; $25,66 \pm 6,65$ et $25,16 \pm 3,86$ mg/dl (tableau X).

Les triglycérides (TG) sont des molécules faisant partie de la catégorie des lipides. L'organisme les synthétise à partir des matières grasses absorbées au niveau intestinal. Par ailleurs le foie peut également les synthétiser à partir du glucose. Ces molécules circulent via le sang de manière naturelle, mais elles peuvent être à l'origine, en cas de quantité trop importante, de pathologies cardiovasculaires dues à leurs dépôts sur les parois des artères (Cheurfa and Allem, 2015).

La concentration sérique des TG dans le groupe traité a été hautement diminuée par l'extrait éthanolique des graines de *P. halepensis* Mill ($52,33 \pm 11,55$ mg/dl) par rapport à la valeur de TG du groupe contrôle hypercholestérolémique ($136 \pm 34,01$ mg/dl) (tableau X).

D'autre part, les lipoprotéines de basse densité (LDL) tirent le cholestérol des tissus de foie vers les tissus périphériques, alors que les lipoprotéines de haute densité (HDL) facilitent la translocation du cholestérol à partir des tissus périphériques au foie pour le catabolisme. Par conséquent, le HDL a un effet utile dans la réduction du cholestérol des tissus, tout en diminuant le niveau de LDL qui a comme conséquence la réduction de risque des maladies cardiovasculaires (Nofer et al., 2002).

Les résultats du tableau X montrent que l'extrait éthanolique a réduit la concentration sérique des LDL dans le groupe traité ($33,33 \pm 3,88$ mg/dl) par rapport à la concentration des LDL dans le groupe contrôle hypercholestérolémique ($49,5 \pm 6,18$ mg/dl) (tableau X).

Une augmentation importante de la concentration des HDL a été constatée dans le groupe traité ($27,33 \pm 3,44$ mg/dl) comparée au groupe contrôle hypercholestérolémique ($8,1 \pm 0,71$ mg/dl).

Tableau X : Résultats du dosage des différents paramètres lipidiques (TC, TG, LDL et HDL) des groupes testés.

Paramètres Groupes	TC (mg/dl) Moy ± Et	TG (mg/dl) Moy ± Et	LDL (mg/dl) Moy ± Et	HDL (mg/dl) Moy ± Et
Groupe contrôle hypercholestérolémique	85,16 ± 11,16	136 ± 34,01	49,5 ± 6,18	8,1 ± 0,71
Groupe traité	72,83 ± 2,99	52,33 ± 11,52	33,33 ± 3,88	27,33 ± 3,44
Groupe contrôle normal	50,16 ± 1,60	60 ± 3,34	25,66 ± 6,65	25,16 ± 3,86

La morbidité et la mortalité par les maladies cardio-vasculaires sont directement liées aux niveaux de cholestérol sérique. La consommation d'un régime alimentaire enrichi en cholestérol augmente le degré de peroxydation des lipides, ce qui est également l'un des débuts des processus de l'athérosclérose. A partir des résultats des différents paramètres lipidiques obtenus on peut déduire le niveau de risque de l'apparition de l'athérosclérose par le calcul d'Index Athérogénique (IA) par la formule suivante (**Kanthe et al., 2012; Nwagha, 2010**) :

$$IA = \log (TG / HDL-c)$$

Dans le groupe contrôle hypercholestérolémique, l'alimentation riche en cholestérol (0,5%) provoque un Index Athérogénique (IA) ($3,18 \pm 0,06$) très élevé par rapport au groupe contrôle normal ($0,30 \pm 0,07$).

Par ailleurs, l'extrait éthanolique des graines de *P. halepensis* Mill induit une diminution très importante de l'IA ($0,27 \pm 0,1$) par rapport au groupe hypercholestérolémique ($3,18 \pm 0,06$) (**Figure 16**).

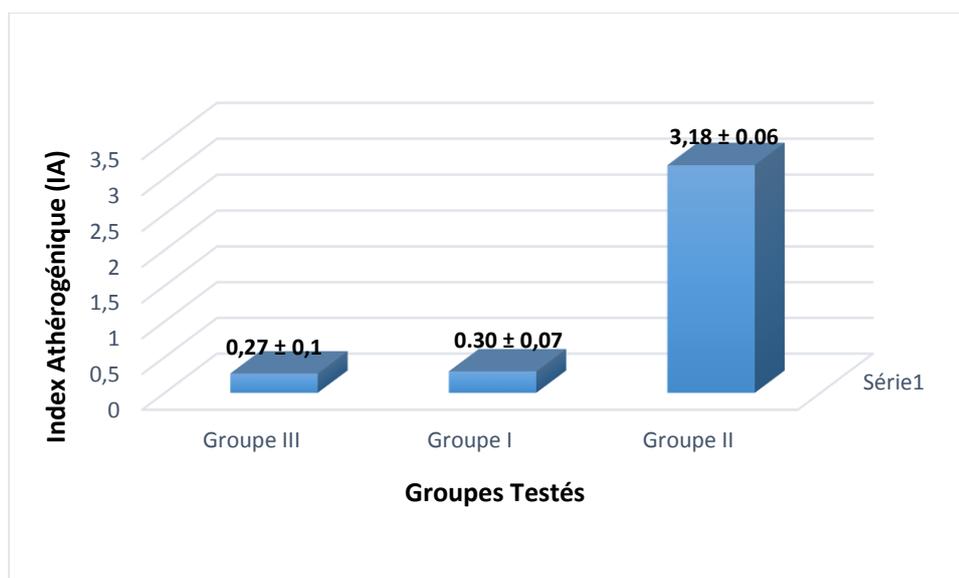


Figure 16 : L'Index Athérogénique (IA) des différents groupes testés.

D'après les résultats obtenus, l'extrait testé a montré une activité hypocholestérolémiante due à la présence des biomolécules qui diminuent le taux de cholestérol dans le sang.

Cette activité peut être due à l'action individuelle ou synergique des composés phénoliques. Le mécanisme possible est le contrôle de l'hydrolyse de certaines lipoprotéines, de leur absorption sélective et leur métabolisme par les différents tissus.

Des études épidémiologiques ont démontré qu'une forte consommation de composés phénoliques est inversement proportionnelle au risque de maladies associées au problème de déséquilibres métaboliques des lipides et des lipoprotéines plasmatique tel que les maladies cardiovasculaires, les maladies coronariennes et l'obésité (**Fuhrman et al., 1995; Tijburg et al., 1997**).

Les flavonoïdes sont très connus pour leurs pouvoirs de baisser le taux de lipides sériques en inhibant l'activité de l'HMG-CoA réductase et régulant l'expression hépatique des proliférateurs de peroxyosomes alpha et gamma (**Sharma et al., 2017**). D'autre part, Les flavonoïdes peuvent renforcer l'activité de la lécithine acyl transférase (LCAT) qui régule les lipides sanguins. La LCAT joue un rôle clé dans l'attachement et la liaison de cholestérol libre en HDL (ce qui peut augmenter le HDL) qui est repris par la suite dans les cellules hépatiques

Arai et al. (2000) Ont montré une corrélation inverse entre la consommation de quercétine et la concentration plasmatique totale de cholestérol, de triglycérides et des LDL.

Par ailleurs, les flavonoïdes agissent comme des antioxydants qui protègent l'oxydation du cholestérol LDL, tout en inhibant l'agrégation plaquettaire, et ils agissent aussi comme des agents anti-inflammatoires et anti-tumoraux (**Cook and Samman, 1996; Manach et al., 1996**).

Plusieurs études ont utilisé ce modèle d'expérience pour montrer l'efficacité de quelques produits naturels ou chimiques sur le métabolisme lipidique, afin de mettre au point certain extrait ou substances à pouvoir hypolipidémiant (**Khanna et al. (2002)**).

V. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'étude a été conçue pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des graines de *P. halepensis* Mill, les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine à 0,1%. Il est testé sur ce modèle l'extrait aqueux, à des concentrations de 100 mg/ml et 200 mg/ml en administration par voie orale. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un médicament le Diclofénac qui est un anti-inflammatoires non stéroïdiens et à ceux du contrôle physiologique.

Le développement œdémateux induit par la carragénine sur les différents groupes testés a été observé et pesé. Les différents résultats obtenus sont représentés dans le **tableau XI** et mettant en valeur les moyennes du poids des pattes et les pourcentages d'inhibition.

Tableau XI : effet de l'extrait aqueux graines *P. halepensis* et le Diclofénac sur l'œdème de la patte induit par la carragénine.

lots	Md (Moy en g ± Et)	Mg (Moy en g ± Et)	% de l'œdème	% de réduction de l'œdème
Essai 1				
100 mg/ml	0,81±0,027	0,128±0,009	41,4	/
Essai 2				
200 mg/ml	0,165±0,009	0,147±0,008	12,24	66,53
témoin	0,168±0,018	0,123±0,01	36,58	/
Référence				
(Diclofénac) 5 mg/ml	0,16±0,01	0,1381±0,013	15,85	56,67

Md: moyenne des pattes droites.

Mg: moyenne des pattes gauches.

En examinant les résultats, on constate une augmentation du poids de l'œdème après l'injection de la carragénine, les souris du groupe contrôle ont développé un œdème de la patte de 36,58 % (**tableau XI**). Chez les souris du groupe traité par l'extrait aqueux (200 mg/ml), on remarque une réduction de l'œdème de la patte par rapport à celle des souris du groupe contrôle, et qui passe de 36,58 % à 12,24 % ce qui correspond à une inhibition de l'inflammation de

66,53% (**tableau XI**). Par contre, pour l'extrait aqueux à 100 mg/ml, la réduction de l'œdème n'était pas détectée.

L'administration du Diclofénac (5 mg/ml), a exhibé une diminution de l'évolution de l'inflammation par rapport aux souris du groupe contrôle, avec un pourcentage d'inhibition de 56,67%.

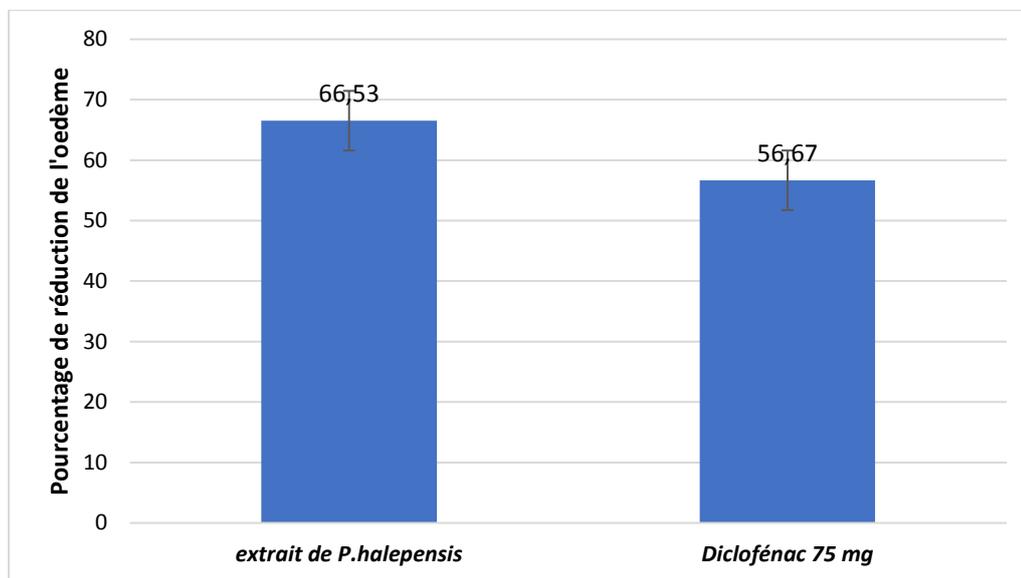


Figure 17: Pourcentage de réduction de l'œdème par l'extrait de *P.halepensis* et Diclofénac 75 mg.

L'évaluation du pourcentage de réduction montre que l'extrait aqueux de *P. halepensis* à une concentration de 200 mg/ml présente un pourcentage de réduction plus élevé que celui de Diclofénac, ceci est dû au fait que la concentration de l'extrait aqueux est plus élevée que la concentration de la solution du Diclofénac administrée (5 mg/ml).

Les résultats obtenus à l'issue des tests anti-inflammatoires montrent que l'extrait aqueux des graines de *p. halepensis* Mill (200 mg/ml), réduit de façon appréciable l'œdème induit par la carragénine. L'inhibition de l'œdème de cet extrait est comparable, à celle de Diclofénac. La richesse de l'extrait aqueux de la plante en différents constituants chimiques peut justifier cette activité.

L'injection de la carragénine provoque une inflammation locale causée par une lésion tissulaire, cette lésion tissulaire induit la synthèse de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire tels que l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes, le PAF (facteur d'activation plaquettaire), les cytokines, le NO (monoxyde d'azote) et le TNF (facteur de nécrose tumorale) (**Dellai et al., 2013**).

Les effets d'extraits aqueux de *P. halepensis* Mill sur l'œdème s'expliqueraient par l'inhibition de la synthèse des substances pro-inflammatoires. Cette inhibition peut être due à la présence des composants actifs comme les polyphénols, qui peuvent exercer leurs propriétés

anti-inflammatoires à des niveaux multiples, grâce à la modulation des voies de signalisation de MAPK (Mitogen activated protein kinases) (Kong et al., 2000), protéines kinases B, les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B (Nuclear factor κ B), (Manna et al., 2000), l'inhibition de la production des cytokines et les chimiokines inflammatoires, la suppression de l'activité de iNOS (nitricoxidesynthase) et cyclooxygénases (COX) (Donnelly et al., 2004; O'Leary et al., 2004) et en diminuant la production de ERO/ERN (Espèces réactives de l'oxygène/ Espèces réactives d'azote) et MAPK qui jouent un rôle crucial dans l'inflammation (Ichikawa et al., 2004).

L'activité anti-inflammatoire exercée par les extraits des plantes peut être due aussi à la présence des flavonoïdes qui ont des capacités à inhiber la dégranulation des neutrophiles. Ce qui influence directement sur la diminution de la libération de l'acide arachidonique par les neutrophiles et d'autres cellules immunitaires (Hoult et al., 1994; Tordera et al., 1994). Ainsi, certains flavonoïdes peuvent inhiber la génération des enzymes comme les eicosanoïdes et l'expression des gènes pro-inflammatoire.

VI. Evaluation de l'activité antispasmodique

Le test de l'acide acétique est largement utilisé pour évaluer l'activité analgésique des extraits de plantes médicinales (Haider et al., 2011). En effet, l'injection intra péritonéale de cet acide chez la souris provoque un syndrome douloureux qui se traduit par des contorsions caractéristiques de type de mouvement d'étirement des pattes arrières et de la musculature dorso-ventrale qui sont fortement liée à la sensibilisation des récepteurs nociceptifs qui vont induire la synthèse des prostaglandines, sérotonine et histamine (Ouédraogo et al., 2012). Les résultats de l'expérience ont été résumés dans le tableau suivant.

:

Tableau XII : effet antispasmodique de l'extrait aqueux des graines de *P. halepensis* Mill à 200 mg/ml et Acépral suite au test de torsion induit par l'acide acétique.

Lots	Moyennes des crampes (moyenne \pm écart type)	% de réduction des crampes
Essai (200 mg/ml)	10,33 \pm 1,96	60,26
Témoin	26 \pm 12,29	/
Référence (Acépral) (50 mg/ml)	1 \pm 0,63	96,15

D'après les résultats (**tableau XII**), nous constatons que les souris du groupe contrôle ont développé un nombre important de crampes et de torsions abdominales de l'ordre $26 \pm 12,29$. Ce qui prouve bien que l'acide acétique a induit une réaction antalgique se traduisant par un étirement des pattes postérieures et une contraction des muscles dorso-abdominale. Chez le groupe traité par l'extrait aqueux de *P. halepensis* Mill à 200 mg/ml ; il a été constaté une réduction importante du nombre de contractions abdominales induite par l'acide acétique $10,33 \pm 1,96$, ce qui donne un pourcentage d'inhibition de 60,26%. Cet effet est inférieur à celui exhibé par l'acide acétylsalicylique (Acépral) à 50 mg/ml ($1 \pm 0,63$), équivalant à un pourcentage d'inhibition de 96,15 %.

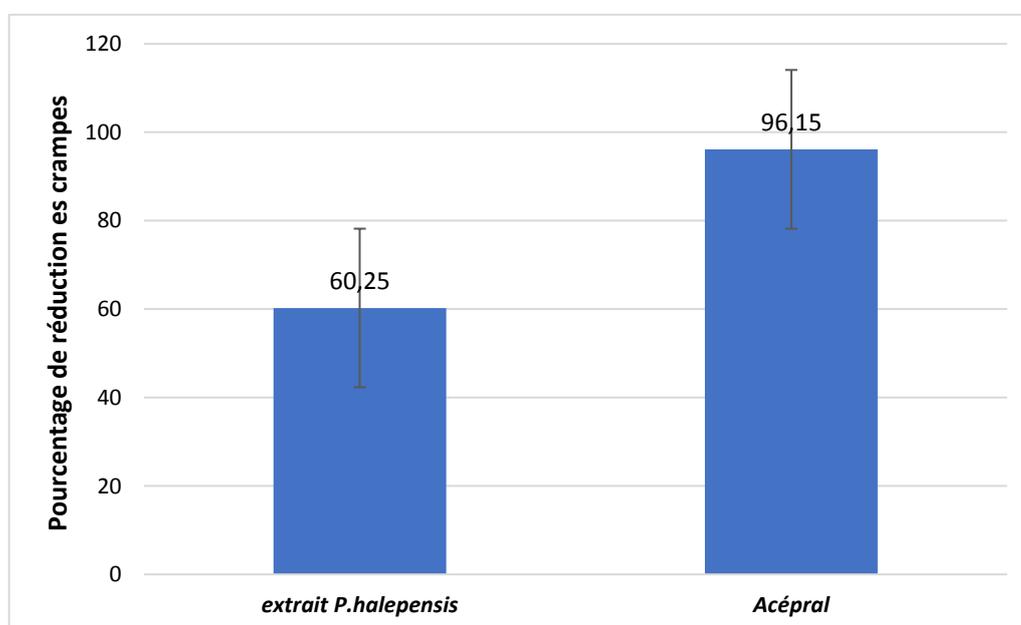


Figure 18 : pourcentage de réduction des crampes par l'extrait de *P. halepensis* Mill et Acépral.

Le test de l'acide acétique est considéré comme un modèle de la douleur viscérale, du fait que la douleur induite par l'acide acétique est similaire à une péritonite (**Le bars et al.,**

2001). Ce test est fréquemment utilisé pour mettre en évidence des substances à effet antalgique périphérique comme les AINS. Avec cette méthode, nos résultats ont montré que l'extrait aqueux à une concentration 200 mg/ml, atténué très significativement la douleur chimique. Dans ce test, les mécanismes impliqués dans la réaction nociceptive sont liés au métabolisme de l'acide arachidonique et à la biosynthèse des prostaglandines par la cyclo-oxygénase (**Duarte et al., 1988; Ueno et al., 2001**). Sur la base de ces données, l'effet inhibiteur de la réponse nociceptive à ce stimulus chimique est dû probablement à l'action inhibitrice de l'extrait testé sur la cyclo-oxygénase et la libération de prostaglandine. Nous pourrions suggérer que l'extrait aqueux agit au niveau périphérique.

Plusieurs études ont rapporté l'action anti-inflammatoire et antispasmodique des extraits de plantes (**Habib and Waheed, 2013; Kumar Saini and Gu Singha, 2012; Ouédraogo et al., 2012**), ses propriétés sont généralement attribuées à la présence des composés phénoliques dans ces extraits, en effet beaucoup de composés phénoliques sont de puissants antioxydants piègeurs directs des espèces réactives de l'oxygène (ERO), et du radical Oxyde nitrique (NO \cdot) impliqué dans l'inflammation et la douleur (**Ghedira, 2005; Halmja et al., 2009**).

*Conclusion générale et
perspective*

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La présente étude avait pour objectifs d'évaluer les activités biologiques de l'extrait phénolique des graines de *Pinus halepensis* Mill à travers différentes méthodes *in vitro* et *in vivo*.

C'est dans ce but que s'inscrit notre travail qui consiste à évaluer l'activité antioxydante *in vitro*, et les activités anti-inflammatoires, antispasmodiques et hypocholestérolémiantes *in vivo* des deux extraits aqueux et éthanolique.

Le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes montre une différence dans les teneurs d'un extrait à un autre. Les teneurs les plus élevées en phénols totaux et en flavonoïdes ont été enregistrées avec l'extrait éthanolique des graines de *P. halepensis* Mill.

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée *in vitro* par le test DPPH, les résultats obtenus confirment que l'extrait éthanolique est doué d'un fort pouvoir antioxydant.

Les extraits testés pour leur activité anti-inflammatoire et antispasmodique *in vivo* ont montré un effet dans la réduction de l'inflammation et la douleur provoquée par l'injection de la carragénine et l'acide acétique respectivement. Ces extraits ont diminué le taux du cholestérol et des triglycérides plasmiqes chez les rats ayant reçu un régime riche en cholestérol, ce qui induit une diminution du risque de l'apparition de l'athérosclérose.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substance source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence à savoir :

Tester ces mêmes extraits en réalisant d'autres testes antioxydants «Pouvoir réducteur, pouvoir chélateur ; blanchiment de B-carotène, peroxydation lipidique... » à différentes concentrations.

Utiliser d'autres concentrations pour les tests *in vivo* déjà réalisés et procéder à l'étude histopathologie.

Fractionner, purifier et identifier la fraction et/ou la molécule responsable de ces activités.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Agrawal AD (2011) Pharmacological activities of flavonoids. *International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology* **4**:1349-1397.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R and Kinae N (2000) Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *The Journal of nutrition* **130**:2243-2250.
- Aurousseau B (2002) Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA productions animales* **15**:67-82.
- Bacchi S, Palumbo P, Sponta A and Coppolito MF (2012) Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs : a review. *Antiinflammatory & Antiallergy Agents in Medicinal Chemistry* **11**:52-64.
- Baudin B (2006) Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt cardio* **2**:43-52.
- Bellahouel S (2012) Etude du pouvoir antimicrobien et mycorhizien de deux espèces de Terfez: *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon et *Terfezia leptoderma* Tul.. Thèse de doctorat en Biologie, Université Ahmed Ben Bella, Oran.
- Belyagoubi N (2011) Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. thèse de Doctorat en Biologie, Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen. .
- Boizot N and Charpentier JP (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra* :79-82.
- Bonnet C, Alamigeon F and Micheels P (2010) *Guide complet des soins esthétiques : du côté de ma vie* (1 ed).
- Boubekri C (2014) Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Mohamed Khider, Biskra.
- Bougandoura N and Bendimerad N (2012) Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*:14-19.

Références bibliographiques

- Bruneton J (1999) Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation Lavoisier* **3**:286-347.
- Cavaillon J-M (2005) Médiateurs de l'inflammation, in *Sepsis sévère et choc septique* (1 ed.). pp 23-49, Springer Paris, Paris.
- Cheikh-Rouhou S, Hentati B, Besbes S, Blecker C, Deroanne C and Attia H (2006) Chemical Composition and Lipid Fraction Characteristics of Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seeds Cultivated in Tunisia. *Food Science and Technology International* **15**:407-416.
- Cheurfa M and Allem R (2015) Study of hypocholesterolemic activity of Algerian *Pistacia lentiscus* leaves extracts in vivo *Brazilian journal of pharmacognosy*: 1-3.
- Colot M (1972) *Notion techniques de pharmacologie générales, Procédure de gésions des documents et des documents et des données* (1 ed.).
- Conde E, Cara C, Moure A, Ruiz E, Castro E and Dominguez H (2009) Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry* **33**:67-87.
- Cook NC and Samman S (1996) Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutrition Biochemistry* **7**:66-76.
- De Peretti C, Nicolau J, Chin F, Tuppin P, Danchin N, Danet S and Lliou MC (2014) Réadaptation cardiaque hospitalière après infarctus du myocarde en France : apports du PMSI-SSR *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **5**:84-92.
- De Quirós ARB, Frecha-Ferreiro AM, Vidal-Pérez AM and López-Hernández J (2010) Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research and Technology* **231**:495-498.
- Dellai A, Souissi H, Borgi W, Bouraoui A and Chouchane N (2013) Antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. *Industrial Crops and Products* **49**:879-882.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouma D, Stocker P and Vidal N (2006) Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* **97**:654-660.
- Djerrad, Kadik L and Djouahri A (2015) Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products* **74**:440-449.
- Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S and Ju YH (2013) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*:1-7.

Références bibliographiques

- Dob T, Berramdane T and Chelgoum C (2005) Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes Rendus Chimie* **8**:1939–1945.
- Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, Russell RE and Barnes PJ (2004) Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**:774-783.
- Duarte ID, Nakamura M and Ferreira SH (1988) Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **21**:341-343.
- Fabienne OL (2013) La Nigelle, une épice d'intérêt médicinal. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Joseph-Fourier- Grenoble.
- Fady B, Semerci H and Vendramin GG (2003) Technical guidelines for genetic conservation and use for Aleppo pine (*Pinus halepensis*) and (Brutia pine). *European Forest genetic resources programme*:1-6.
- Favier A (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*:108-115.
- Feikh (2014) Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en algérie. Thèse de Doctorat en Chimie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Feknous S, Saidi F and Mohamed-Said R (2014) Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Nature & Technology* **11**:7-13.
- Franchomme P (2015) *La science des huiles essentielles médicinales* (1 ed).
- Fuhrman B, Lavy A and Aviram M (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American journal of clinical nutrition* **61**:549-554.
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z and Jore D (2003) Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *l'actualité chimique*:91-96.
- Gauche E and Hausswirth C (2006) Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité* **58**:43-66.
- Ghanmi M, Satrani B, Chaouch A, Aafi A, Abid AE, Ismaili MR and Farah A (2007) Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin

Références bibliographiques

- maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, **154**:293-300.
- Ghedira K (2005) Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*: 162-169.
- Ghougali (2011) Contribution à l'évaluation de la diversité et du contrôle génétique de la croissance et de la fructification chez les pins de types halepensis (*Pinus brutia*-*Pinus halepensis*), in *Ecologie des forêts méditerranéennes*, Nancy-université Université Henri Poincaré
- Gonzalez-Gallego J, Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S and Tunon M (2010) Fruit, polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition* **104**:15-27.
- Goudable J and Favier A (1997) Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **11**:115-112.
- Green RJ (2004) Antioxydant activity of peanut plant tissues. Thèse de Doctorat en Science, university of North Carolina, USA.
- Guit B (2015) Croissance et état sanitaire des peuplements de Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) dans le massif forestier de Senalba (région de Djelfa). Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, Ecole nationale supérieure d'agronomie, Alger.
- Gulcan A, Kupeli E, Eryavuz A, Yesilada E and Kucukkurt I (2006) Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **107**:418-423.
- Guri A, Kefalas P and Roussis V (2006) Antioxidant Potential of Six Pine Species. *Phytotherapy research* **20**.
- Habib M and Waheed I (2013) Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory and antipyrétique activities of *Scoparia* hydromethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology* **145**:18-24.
- Haider S, Nazreen S, Alam MM, Gupta A, Hamid H and Alam MS (2011) Antiinflammatory and anti-nociceptive activities of ethanolic extract and its various fractions from *Adiantum capillus veneris* Linn. *Ethnopharmacology* **138**:741-747.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C and Chapelle JP (2007) Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liege* **62**:628-638.
- Halmja K, Vaher M, Pussa T and Kaljurand M (2009) Analysis of the stable free radical scavenging capability of artificial polyphenol mixtures and plant extract by capillary electrophoresis and liquid chromatography-diode array detection- tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography* **1216**:2417-2423.

Références bibliographiques

- Heim EK, Tagliaferro AR and Bobilya DJ (2002) Flavonoïds antioxydants : chemistry ; metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry* **13**:152-584.
- Hoult JR, Moroney MA and Paya M (1994) Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods Enzymology* **234**.
- Huang X, Li, B., Shen, L. (2014) Studies on the anti-inflammatory effect and its mechanisms of sophoridine. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **10**:1155-1161.
- Ichikawa D, Matsui A, Imai M, Sonoda Y and Kasahara T (2004) Effect of various catechins on the IL-12 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **27**:1353-1358.
- Jouzeau JY, Daouphars M, Benani A and Netter P (2004) [Pharmacology and classification of cyclooxygenase inhibitors]. *Gastroenterologie clinique et biologique* **28 Spec No 3**:C7-17.
- Kadri, Khettal B, Aid Y, Kherfella S, Sobhi W and Barragan-Montero V (2015) Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food chemistry* **188**:184-192.
- Kadri N, Khettal B, Adjebli A, Cresteil T, Yahiaoui-zaidi R, Barragan-Montero V and Montero JL (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, Yahiaoui-zaidi R, Barragan-Montero V and Montero JL (2013) Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria. *Industrial Crops and Products* **51**:116-122.
- Kähkönen M, Hopia A, Rauha J, Pihlaja K, Kujala T and Heinonen M (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**:62-3954.
- Kanthe PS, Patil BS, Bagali S, Deshpande A, Shaikh GB and Aithala M (2012) Atherogenic Index as a Predictor of Cardiovascular Risk among Women with Different Grades of Obesity. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health* **4**:1767-1774.
- Khanna A, Rizvi F and Chander R (2002) Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *Journal of ethnopharmacology* **82**:19-22.

Références bibliographiques

- Khera N and Bhatia A (2012) Antihyperlipedemic Activity of Woodfordia fruticosa Extract in High Cholesterol Diet Fed Mice. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* **2**:211-215.
- Kim HP, Son KH, Chang HW and Kang SS (1996) Flavonoids, potential anti-inflammatory agents. *Natural Product Sciences* **2**:1-8.
- Kim HP, Son KH, Chang HW and Kang SS (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* **96**:229-245.
- Koehlin-Ramonatxo C (2006) Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* **20**:165-177.
- Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekr S and Primiano T (2000) Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Archives of Pharmacal Research* **23**:1-16.
- Konkon NG, Simaga D, Adjoungova AL, N'Guessan KE, Zirihi CN and Koné BD (2006) Etude phytochimique de mitragyna inermis (willd.) o. ktze (rubiaceae), plante a feuille antidiabetique. *Pharmcpée et Médecine Traditionnelle Africaine* **14**:73-80.
- Kumar Saini N and Gu Singha M (2012) Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of metabolic Tecomaria capensis leaves extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*:870-874.
- Kumar V, Abbas AK, Nelson F and Mitchell R (2017) *Robbins Basc Pathology* (8 ed).
- Landis GN and Tower J (2005) Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development* **126**:365-379.
- Le bars D, Gozariu M and Cadden SW (2001) Animal models of nociception *Pharmacological Reviews* **53**:599-652
- Levy I (1969) Carageenan paws oedema in the mouse. *Life science* **8**:601-606.
- Li CY and Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **282**:227-241.
- Locatelli M, Gingro R, Travaglia F, Coisson JD, Maurizio R and Arlorio M (2009) Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry* **114**:889-897.
- Lopes Souto A, Tavares JF, Sobral da Silva M, Formiga Melo Diniz MF, Filgueiras de Athayde-Filho P and Barbosa Filho JM (2011) Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. *Molecules* **16**:8515-8534.

Références bibliographiques

- Maestrea FT, Cortina J, Bautista S and Bellota J (2003) Does *Pinus halepensis* facilitate the establishment of shrubs in Mediterranean semi-arid afforestations? *Forest Ecology and Management* **176**:147-160.
- Manach C, Regeat F and Texier O (1996) Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research* **16**:517-544.
- Manna SK, Mukhopadhyay A and Aggarwal BB (2000) Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *The Journal of Immunology* **164**:6509-6519.
- Milane H (2004) La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat en Sciences, université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Mohammedi K, Patente TA, Bellili-Muñoz N, Driss F, Monteiro MB, Roussel R, Pavin EJ, Seta N, Fumeron F, Azevedo MJ, Canani LH, Hadjadj S, Marre M, Corrêa-Giannella ML and Velho G (2013) Catalase activity, allelic variations in the catalase gene and risk of kidney complications in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* **56**:2733-2742.
- Mohammedi Z (2011) Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphyllia* (L.) karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2**:609-615.
- Mortensen A, Skibsted LH and Truscott TG (2001) The Interaction of Dietary Carotenoids with Radical Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **385**:13-19.
- Mota MIR, Thomas G and Barbosa F (1985) Anti-inflammatory and analgesic Activity of *Anacardium Occidentale* Leaf Extracts. *JMJ Ethnopharmacology* **13**:289.
- Mouhoubi-Tafinine Z, Ouchemoukh S and Tamzndjari A (2016) Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products* **88**:85-90.
- Nahal I (1962) Etude taxonomique, phytogéographique écologique et sylvicole, in *écologie nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences*.
- Nasar MA, Jarrari A, Subhani T, Shetty B and Shakeel F (2009) Antioxydant status of atorvastatin in hypercholesterolemic patients. *Journal of Serbiab Chemical Society* **74**:1063-1073.
- Nergiz C and İclalDönmez (2004) Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food chemistry* **86**:365-368.
- Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP and Charmandari E (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* **75**:1-12.

Références bibliographiques

- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G and Eckardstein A (2002) HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* **161**:1-16.
- Noyan A (1996) *Lipid Metabolizması*, Meteksan yayınları.
- Nwagha UI (2010) Atherogenic index of plasma as useful predictor of cardiovascular risk among postmenopausal women in Enugu, Nigeria. *African Health Sciences* **10**:248-252.
- O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, P.W. N, Bao YP, O'Brien NM and Williamson G (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research* **551**:245-254.
- Oguntibeju OO, Quiney C, Turner SD and Cotter TG (2009) Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukimia* **23**:1432-1440.
- Orban JC, Ichai C and Quintard H (2011) *Désordres métaboliques et réanimation* (1 ed).
- Ouédrago N, Lompo M, Sawadogo RW, Tibiri A, Hay AE, Koudou J, Dijoux MG and Guissou IP (2012) Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie* **10**:286-292.
- Parvin S, Das N, Jahan N, Akhter MA, Nahar L and Ekramul MD (2015) Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BioMed Central Des Notes* **8**:1-7.
- Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Pant R, Menon VP, Otani H and Maulik N (2007) Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *Journal Of Molecular and Cellular cardiology* **42**:508-516.
- Popovici C, Saykova L and Tylkowski B (2009) Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* **4**:25-39.
- Pothitirat W, Chomnawang MT, Supabphol R and Gritsanapan W (2009) Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. . *Fitoterapia* **80**:141-164.
- Potta SP, Doss MX, Hescheler J and Sachinidis A (2005) Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): A Structural Target for the Development of Potential Therapeutic Drugs Against Anti-Proliferative Diseases. *Drug Design Reviews - Online* **2**:85-91.
- Pryor WA (2000) vitamin E and heart disease : basic science to clinical in intervention trials. *Free Radical Biology & Medicine* **28**:141-164.

Références bibliographiques

- Quezel P and Barbero M (1992) Le pin d'Alep et les espèces voisines: Répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. *forêt méditerranéenne* **13**.
- Rhazi N, Oumam M, Hannache H, Sesbou A, Charrier B, Pizzi A and Charrier-El bouhtoury F (2015) Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan Acacia mollissimabark. *Industrial Crops and Products* **70**:245-252.
- Robinson JG (2013) Management of familial hypercholesterolemia : a review of the hypercholesterolemia. *Journal of Managed Care Pharmacy* **19**:139-149.
- Rohdewald P (2002) A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **40**:158-168.
- Rolland Y (2004) Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux Corps gras Lipides* **11**:419-424.
- Rosin BL (2007) The progression of cardiovascular risk to cardiovascular disease. *Cardiovascular Medicine* **8**:3-8.
- Ryan D, Robards K and Lavee S (1999) Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology* **34**:265-274.
- Sanchez-Moreno C (2002) Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* **8**:121-137.
- Šarac Z, Matejić JS, Stojanović- Radić- ZZ, Veselinović JB, Džamić AM, Bojović S and Marin PD (2014b) Biological activity of Pinus nigra terpenes—Evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in Biology and Medicine*.
- Sarazin P (1987) Les hypercholestérolémies et leur prise en charge. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Rouen-UFR de Médecine et de Pharmacie.
- Sharma A, Flores-Vallejo RdC, Cardoso-Taketa A and Villarreal ML (2017) Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **208**:264-329.
- Singh S and Bittner V (2015) Familial hypercholesterolemia-epidemiology, diagnosis, and screening. *Current Atherosclerosis Reports* **17**:2-8.
- Singleton VL and Rossi JAj (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**:85-144.

Références bibliographiques

- Smaïhi AH (2009) Influence du type de pineraies (pineraie, pineraie chenaie) sur la mobilisation de N,P et le comportement de la plantules de pin d'Alep dans des sols forestiers de la région de Batna. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, Université El Hadj Lakhdar, Batna.
- Talbi H, Boumaza A, El-mostafa K, Talbi J and Hilali A (2015) Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Journal of Materials and Environmental Science* **6**:1111-1117.
- Tamer F (2003) Free radicals, Types, sources and damaging reactions. *Internal Medicine Articles*.
- Techer S (2013) Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Thèse de Doctorat en Sciences, Université de la Réunion.
- Tessier F and Marconnet P (1995) Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports* **10**:1-13.
- Tijburg L, Mattern T, Folts J, Weisgerber U and Katan M (1997) Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **37**:771-785.
- Tordera M, Ferrandiz ML and Alcaraz MJ (1994) Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. *Zeitschrift für Naturforschung [C]* **49**:40-235.
- Torres De Pinedo A, Pen Alver P and Morales JC (2007) Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chemistry* **103**:55-61.
- Ueno A, Matsumoto H, Naraba H, Ikeda Y, Ushikubi F, Matsuoka T, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A and S. O-i (2001) Major roles of prostanoid receptors IP and EP(3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception. *Biochemical Pharmacological* **62**:157-160.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, J.Rhods C and Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* **266**:37-56.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**:1-40.
- Van Antwerpen P (2006) Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de Doctorat e Pharmacie, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.

Références bibliographiques

- Vasson M-P and Reimund J-M (2007) Nutrition, immunité et inflammation, in *Traité de nutrition artificielle de l'adulte* pp 455-472, Springer Paris, Paris.
- Vogel H and Vogel WH (1997) *Drug discovery and evaluation : Pharmacological assays* (3 ed), Springer-verlag, Berlin.
- Vuorela S, Kreander K, Karonen M, Nieminen R, Hämäläinen R, Galkin A, Laitinen A, Salminen P, Moilanen E, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P and Heinonen M (2005) Preclinical Evaluation of Rapeseed, Raspberry, and Pine Bark Phenolics for Health Related Effects. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **53**:5922–5931.
- Wannes WA and Marzouk B (2016) Characterization of myrtle seed (*Myrtus communis* var. *baetica*) as a source of lipids, phenolics, and antioxidant activities. *Journal of Food and Drug Analysis* **24**:316-323.
- Wen CC, Chen HM and Yang NS (2012) Developing phytochemicals from medicinal plants as immunomodulators. *Advances in Botanical Research* **62**:198-251.
- Wollinger A, Perrin E, Chahboun J and Jeannot V (2016) Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie* **xxx**:1-12.
- Wu N, Fu K, Fu YJ, Zu YG, Chang FR and Chen YH (2009) Antioxidant Activities of Extracts and Main Components of Pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. Leaves. *molecules* **14**:1032-1043.
- Yvette R (2012) screening pharmacologique de substances d'origine naturelle et de synthèse. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Mohammed V, Souissi.

Annexes

Annexe N°1

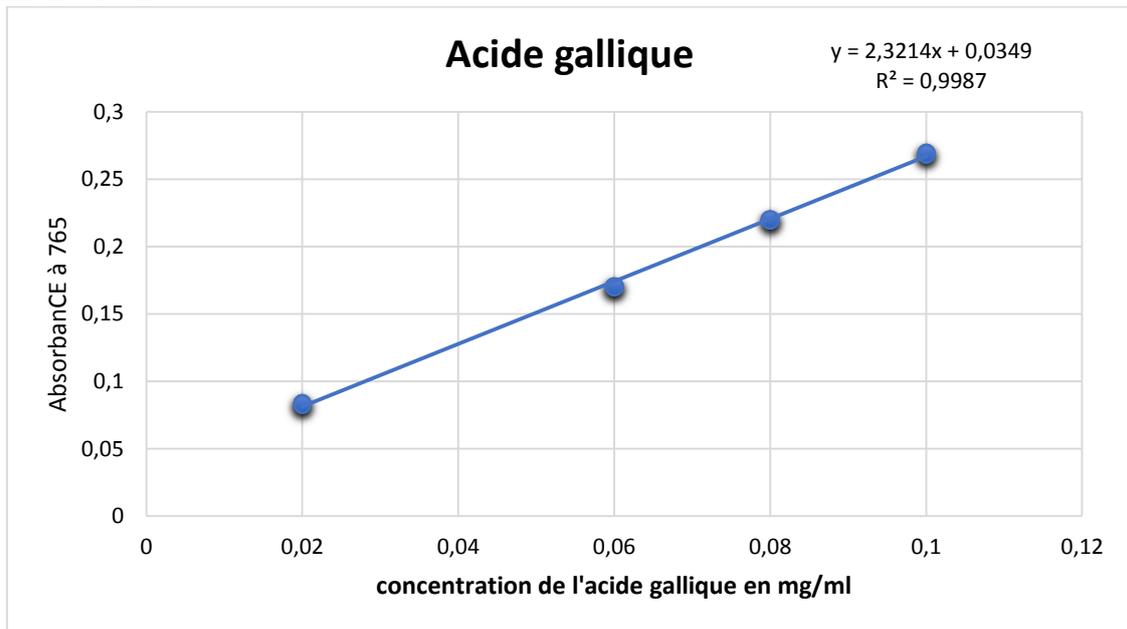


Figure 01 : Courbe d'étalonnage du standard acide gallique utilisé dans le dosage des polyphénols totaux.

Annexe N°02

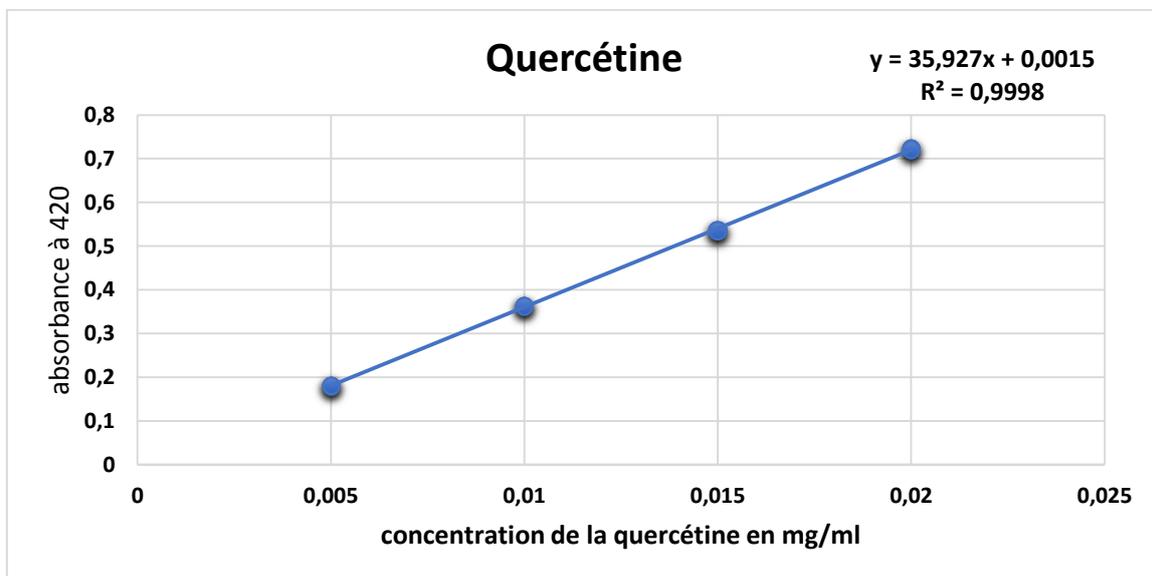


Figure 02 : Courbe d'étalonnage du standard Quercétine utilisé dans le dosage des flavonoïdes.

Annexe N°03

Tableau I : Composition de régime standard.

Matières premières	Quantités (g/Kg)	Pourcentage (%)
Mais	326	32,6
Saccharose	326	32,6
Protéine	168	16,8
Cellulose	40	4
Minéraux	20	2
Vitamine	20	2
Huile	40	4

Annexe N°04



Figure 03 : prélèvement du sang à partir du sinus rétro-orbital.



Figure 04 : les échantillons du sang collectés.



Figure 05 : les sérums récupérés après la centrifugation.

Annexe N°05

1. Préparation de la solution de carragénine

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

2. Préparation de la solution de référence

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

Résumé

Le pin est l'une des plantes médicinales traditionnelles qui possède de nombreuses propriétés biologiques, qui sont attribuées à sa richesse en composés phénoliques. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'extrait éthanolique et aqueux des graines de *Pinus halepensis* Mill et évaluation de leurs propriétés antioxydantes *in vitro* et anti-inflammatoires, antispasmodiques et hypocholestérolémiantes *in vivo*. Les résultats de dosage montrent la richesse d'extrait éthanolique en phénols totaux ($4,02 \pm 0,00\text{mg Eq AG/ g}$), suivi des flavonoïdes ($0,27 \pm 0,001\text{mg Eq Q/ g}$) par rapport à l'extrait aqueux. Une concentration maximale d'extrait éthanolique (100 mg/ml), présente une activité réductrice importante ($42,02 \pm 0,042\text{mg/ml}$) et une forte activité scavenger contre le radical DPPH. L'expérimentation animale a été entreprise dans cette étude par évaluation des tests *in vivo* sur des rats et des souris qui ont montré une activité vis-à-vis de l'inflammation et la douleur engendrée par la carragénine et l'acide acétique respectivement, ainsi que la capacité de diminuer les paramètres lipidiques dans le sang lors d'un régime riche en cholestérol. A la lumière de ces résultats, nous suggérons l'utilisation de cette plante ou de ces composants dans la prévention de plusieurs pathologies.

Mots clés : *Pinus halepensis* Mill, polyphénols, Activité antioxydante, Activité antispasmodique, Activité anti-inflammatoire, Activité hypocholestérolémiante.

Abstract

Pine is one of the traditional medicinal plants that possesses many biological properties, which are, which are attributed to its richness in phenolic compounds. As part of this work, we investigated the ethanolic and aqueous extracts of *Pinus halepensis* Mill seeds and evaluated their antioxidant properties *in vitro* and anti-inflammatory, antispasmodic and hypocholesterolemic properties *in vivo*. The assay results show the richness of ethanol extract in total phenols ($4.02 \pm 0.00\text{mg Eq AG / g}$), followed by flavonoids ($0.27 \pm 0.001 \text{ mg Eq Q / g}$) relative to the aqueous extract. A maximum concentration of ethanolic extract (100 mg / ml) has a significant reducing activity ($42.02 \pm 0.042 \text{ mg / ml}$) and a strong scavenger activity against the radical DPPH. Animal experimentation was undertaken in this study by evaluating *in vivo* tests on rats and mice that showed activity against inflammation and pain caused by carrageenan and acetic acid, respectively, as well as the ability to decrease lipid parameters in the blood during a high cholesterol diet. In light of these results, we suggest the use of this plant or its components in the prevention of several pathologies.

Keywords: *Pinus halepensis* Mill, Antioxidant activity, Antispasmodic activity, Anti-inflammatory activity, Hypocholesterolemic activity.

ملخص

الصنوبر هو واحد من النباتات الطبية التقليدية التي لديها العديد من الخصائص البيولوجية، والتي تنسب إلى ثرائها في المركبات الفينولية. كجزء من هذا العمل، قمنا بالتحري عن المستخلصات الإيثانولية والمائية لبذور *Pinus halepensis* Mill وتقييم خواصها المضادة للاكسدة *in vitro* والمضاد للالتهابات والتنشج ونسبة الكولسترول العالية *in vivo*. تظهر نتائج الفحص ثراء المستخلص الإيثانولي في الفينولات الكلية ($4,02 \pm 0,00$ ملغ معادلة للأسيد غاليك / غ)، تليها الفلافونيدات ($0,27 \pm 0,001$ ملغ معادلة للكارسنين / غ) بالنسبة إلى المستخلص المائي. التركيز الأقصى للمستخلص الإيثانولي (100 ملغ/ غ) مثل قدرة ارجاع عالية ($42,02 \pm 0,042$) ونشاطية عالية في إزاحة جذر DPPH. في هذه الدراسة، التجارب على الحيوانات أجريت على الفئران والجرذان والتي أظهرت نشاطا ضد الالتهاب والالم الناتجين عن الكراجنان والحمض الخليك على التوالي، وكذلك القدرة على خفض نسبة الكولسترول من خلال اتباع نظام غذائي يحتوي على كمية مرتفعة من الكولسترول. في ضوء هذه النتائج، فإننا نقترح استخدام هذه النباتات او مكوناتها في الوقاية من الامراض.

الكلمات المفتاحية *Pinus halepensis* Mill ، البوليفينولات، النشاط المضاد للاكسدة، النشاط المضاد للالتهابات، النشاط المضاد للتنشج، نشاط خفض الكولسترول.

