

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/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques
Présenté par :

Mlle. MAMERI Amal

Thème

***Evaluation de l'activité antioxydante et anti-hémolytique de deux
plantes médicinales locales Pinus halepensis Mill. et Dittrichia
viscosa***

Soutenu le : 01/07/2017

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M.REMINI Hocine</i>	<i>MAB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M.KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M.CHERGUI Achour</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2016/2017

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/2017

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

Domaine : SNV **Filière : Sciences Biologiques**
Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques
Présenté par :

Mlle. MAMERI Amal

Thème

*Evaluation de l'activité antioxydante et anti-hémolytique de deux
plantes médicinales locales Pinus halepensis Mill. et Dittrichia
viscosa*

Soutenu le : 01/07/2017

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M.REMINI Hocine</i>	<i>MAB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M.KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M.CHERGUI Achour</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2016/2017

''Tu dis oui à ton projet et tu l'interromps avec un « mais ». ce petit mot est souvent toute la distance qui sépare la réussite de l'échec, car il signifie que tu ne veux pas vraiment ce que tu dis vouloir. Ou qu'il ya autres choses que tu veux avec plus de force.''

Alain HOUEL

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience d'accomplir ce travail.

J'adresse tout d'abord mes vifs remerciements à Monsieur KADRI Nabil Maître de conférences à l'université de Bouira. Merci d'avoir accepté de diriger ce mémoire. Celui qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. Puisse ce travail être à la hauteur de la confiance que vous m'avez toujours accordée.

Je remercie Monsieur REMINI Hocine maitre-assistant à l'université de Bouira d'avoir accepté de présider le jury de mon mémoire. Qu'il soit assuré de ma plus entière reconnaissance pour m'avoir toujours aidé durant mon stage afin d'avancer dans ce périlleux travail, enrichis avec toute votre bienveillance, votre disponibilité et votre savoir.

je remercie vivement Monsieur CHERGUI Achour, maitre-assistant à l'université de Bouira pour avoir accepté de juger et d'examiner ce travail. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir d'avoir pu faire votre connaissance et de pouvoir aujourd'hui vous soumettre mon mémoire de Master. Ainsi merci pour les connaissances que vous m'avez partagé durant mon cursus universitaire.

J'adresse mes profonds remerciements à Monsieur DAHMOUNE Farid maitre de conférence à l'université de Bouira de m'avoir donné de précieux conseils. Consciente de vos nombreuses responsabilités, je suis particulièrement touchée du temps que vous m'avez accordé.

Je voudrais remercier M^{lle} DAHMOUNE Bouchra, j e ne saurais jamais la, remercier assez pour son aide, sa disponibilité, et sa sympathie. A cette même occasion je tiens à remercier M^{me} BESNSMAIL Souhila, et tous les enseignants de la faculté SNVST pour leur aide et leur savoir ainsi tout les ingénieurs des laboratoires de la faculté SNVST

Je présente mes sincères remerciements à Monsieur Amouche Ahmed de m'avoir fourni les produits nécessaires pour la réalisation de mon travail.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin à la réalisation de ce travail.

DÉDICACES

A Ceux qui sont les plus chers ,MES PARENTS qui m'ont aidé à ce que je suis, avec tant d'amour. En témoignage de mes profondes affectations,qu'ils sachent que ce modeste travail est en partie le fruit de leurs soutien ; je leurs suis très reconnaissante. Leurs fiertés à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses. Merci pour toi papa, ta confiance a été toujours pour moi un encouragement vers un nouvel horizon. Merci pour m'avoir appris que le savoir est une richesse , que nul ne peut voler.

A mes frères, secours de ma vie pour leur aide et leur soutient

Hilal et sa femme Houda et leur princesse ALAA EL Rahmane

Rabia pour son amitié et sa femme Hayet

A mes chères sœurs : Noura, Nawel et mes deux neveux Amine et Abdo

A la mémoire de mes deux grands paren

A mes grands-parents paternel que DIEU les protège

A mes amies d'enfance : Meriem, Nacera, Mouna et mon âme sœur Hayet Afaf

A mes amies, rien ne peut exprimer l'amour que je vous porte M WA Z IS

(Salwa,Zineb,Syfia,Wassila Malika et Meriem), je vous adore mes sœurs

A toute ma famille surtout 'MAMERI' et 'MASBAH', cousins (Hicham ,Azzedine ,Rida) et cousines et à tous ceux qui ont contribué un jour à mon éducation

A mes chers enseignants de la faculté SNV, veuillez recevoir ma profonde gratitude administrateurs

Et enfin, il y a les compagnons de route, ceux avec qui l'on partage les joies du quotidien, les doutes je suis heureuse de vous avoir rencontré. Un grand merci à Sarah, Nadjat, Ibtissem, HadjerKouter, Chahinez, Manel, Lamia,Ahlam,Sabrina

A ma promotion de Master Analyses biologiques et biochimiques, et à tous les étudiants de notre faculté.

A Toute personne qui a contribué à la réalisation de ce travail, Merci.

A tous ceux qui m'ont consacré temps, patience et conseils surtout dans les moments difficiles , qui m'aiment et qui j'aime .

Merci

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....2

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Stress oxydant

I.1. Physiologie de l'oxydation.....3

I.2. Physiopathologie de l'oxydation3

I.3. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant.....4

I.4. Radicaux libres et Stress oxydatif.....4

I.4.1. Radicaux libres.....4

I.4.2. Stress oxydatif5

I.5. Nature et sources cellulaires des ERO.....6

I.5.1. Le radical anion superoxyde.....6

I.5.2. Le peroxyde d'hydrogène.....7

I.5.3. Le radical hydroxyle.....7

I.5.4. L'oxygène singulier.....8

I.6. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'azote (ERN).....8

I.6.1. Le monoxyde d'azote9

I.6.2. Le peroxy-nitrite (ONOO ⁻).....	9
I.7. Implications pathologiques du stress oxydatif.....	10
I.8. Cibles biologiques de radicaux libres.....	10
I.9. Les antioxydants.....	12
I.9.1. Antioxydants enzymatiques.....	13
I.9.2. Antioxydants non enzymatiques.....	14
 Chapitre II : Plantes médicinales	
II.1. <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	16
II.1.1. Origine et description botanique.....	16
II.1.2. Taxonomie.....	17
II.1.3. Répartition géographique.....	17
II.1.4. Composition chimique	18
II.1.5. Utilisation de <i>P.halepensis</i> Mill.....	19
II.1.6. Propriétés biologiques du genre <i>Pinus</i>	20
II.2. <i>Inula viscosa</i>	21
II.2.1. Origine et description botanique.....	21
II.2.2. Taxonomie	22
II.2.3. Ecologie et répartition géographique.....	22
II.2.4. Composition chimique	23
II.2.5. Utilisation et propriétés biologiques.....	23

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et méthodes

III.1. Matériels utilisés.....	25
III.1.2. Réactifs et consommables	26
III.1.3. Matériel biologique.....	26
III.1.4. Matière végétale.....	26
III.1.4.1. Présentation de la zone d'étude.....	26
III.1.4.2. Préparation des échantillons.....	27
III.2. Méthodes.....	27
III.2.1. Extraction des polyphénols totaux.....	27
III.2.1.1. Extraction conventionnelle (EC).....	28
III.2.1.2. Extraction assistée par micro-onde (MAE).....	28
III.2.1.3 Extraction assistée par ultrasons (UAE).....	28
III.2.1.4. Macération.....	28
III.2.2. Criblage phytochimique	31
III.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	31
III.2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	32
III.2.3. Activité biologique	32
A. Etude de l'activité antioxydant <i>in vitro</i>	33
III.2.3.1. Evaluation par le test de DPPH	33
III.2.3.2. Pouvoir réducteur :Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP).....	34

III.2.3.3. Mesure de l'activité antioxydante par réactivité avec le radical hydroxyle35

B. Activité anti-hémolytique sur des cellules sanguines humaines.....35

Chapitre IV :Résultats et discussion

IV.1. Le rendement d'extraction.....37

IV.2. Criblage phytochimique.....38

IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux38

IV.2.2. Dosage des flavonoïdes.....39

IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante41

IV.3.1. L'inhibition du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....41

IV.3.2. Pouvoir réducteur : FRAP.....43

IV.3.3. Evaluation de la capacité de piégeage de radical hydroxyle.....44

IV.4. Activité anti hémolytique.....46

Conclusion et perspectives.....48

Références bibliographiques

Annexes

Listes des abréviations

AGPI Acides gras polyinsaturés

AP1 Activation protein-1

EOR Espèces Oxygénées Réactives

ERN Espèces réactives de l'azote

GSH Glutathion

GSSG Glutathion oxydé

GSR Glutathion réductase

HSF1 Heat shock factor 1

HSP Heat Shock Protein

NOS la nitrique oxyde synthase

ROS Réactive oxygen species

SOD Superoxyde dismutase

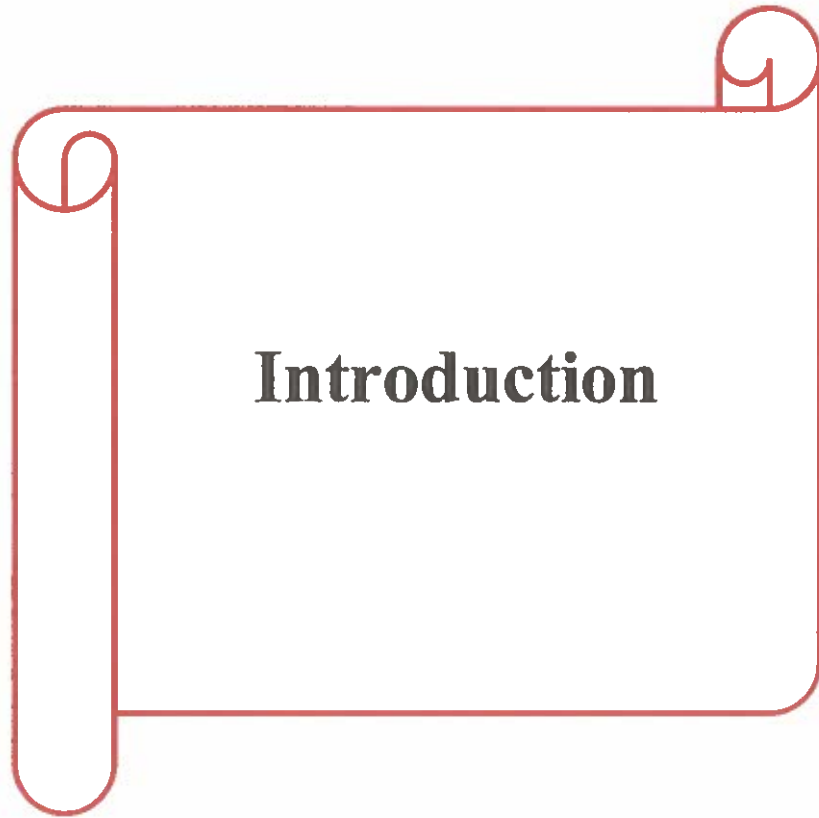
XO Xanthine oxydase

Listes des tableaux

Tableau I: Les espèces réactives oxygénées ERO	5
Tableau II: Les différents types d'antioxydants	12
Tableau III: Systématique de <i>Pinus halepensis</i> Mill	17
Tableau IV: Composition chimique de graines de pin d'Alep	18
Tableau V: Systématique de <i>Dittrichia viscosa</i>	22

Liste des figures

Figure 1 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR	11
Figure 2: Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres.....	13
Figure 3 : structure chimique de tocophérol (vitamine E)	14
Figure 4 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	15
Figure 5: <i>Pinus halepensis</i> Mill.	16
Figure 6: Répartition de Pin d'Alep dans le bassin méditerranéen	18
Figure 7: <i>Dittrichia viscosa</i>	22
Figure 8: Carte géographique de la wilaya de Bouira.	26
Figure 9: Schéma général de l'extraction des polyphénols de <i>D.viscosa</i>	29
Figure 10: Schéma général d'extraction de <i>P. halepensis</i> Mill	30
Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	33
Figure 12: Rendement d'extraction des polyphénols.....	37
Figure 13: Teneur des extraits en polyphénols totaux	38
Figure 14 : Teneur des extraits en flavonoïdes	40
Figure 15: Pourcentage d'inhibition de radical DPPH.....	41
Figure 16: Histogramme montrant le pouvoir réducteur.....	43
Figure 17: Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle	45
Figure 18: Pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse	46



Introduction

Les espèces réactives de l'oxygène sont indispensables à la vie, car elles sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques tel que la signalisation cellulaire (Fernandez et al., 2013, Melo-Silveira et al., 2011). Quand la génération de ces espèces excède les niveaux du mécanisme antioxydant d'un système biologique, elle mène aux dommages oxydants des tissus et des biomolécules (les lipides, les protéines et les acides nucléiques) (Janakiraman and Jeyaprakash, 2015). L'effort oxydant via son état augmenté aboutit aux états de maladies chez l'homme, en particulier les maladies dégénératives, la toxicité, le cancer et diabète (Chahmi et al., 2015, Melo-Silveira et al., 2011). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles, puisque ,vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la notion de «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement (Haleng et al., 2007) .

En 1969, les Américains Mc Cord et Fridovich ont isolé à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase, capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des radicaux libres. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants (Haleng et al., 2007).

Les antioxydants ont récemment attiré une attention considérable en raison de leur potentiel en tant qu'extracteurs d'espèces réactives d'oxygène. Ainsi, beaucoup d'antioxydants ont été identifiés pour l'usage comme additifs. Le butyle hydroxy toluène, le butyle hydroxyanisole et le gallate propylée ont été employés comme antioxydants dans l'industrie alimentaire (Melo-Silveira et al., 2011). En revanche, l'utilisation de ces molécules synthétiques est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels (Bougandoura and Bendimerad, 2013, Jun et al., 2011).


Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées en alternative (Barros et al., 2007). En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires ; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Bougandoura and Bendimerad, 2013, Jun et al., 2011).

L'intérêt majeur de ce travail est de valoriser et de mettre en évidence les activités biologiques des extraits de *Pinus halepensis* Mill. et *Dittrichia viscosa*, issues du screening de plantes traditionnellement utilisées en Algérie.

Dans un premier temps nous nous focaliserons sur l'extraction et le dosage des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes), par la suite sur l'étude de l'activité antioxydante des différents extraits en utilisant plusieurs méthodes expérimentales [le test de (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) ; effet scavenger contre le radical hydroxyle et le pouvoir réducteur (FRAP)]. Des tests d'évaluation de l'activité anti hémolytique ont été également menés.

Cette étude comporte deux parties :

- La première partie, est consacrée à une synthèse bibliographique sur le stress oxydant, les plantes étudiées et l'intérêt des composés phénoliques.
- La seconde décrit la partie expérimentale
 - Une présentation des techniques d'extraction, des dosages spectrophotométriques, des tests antioxydants et anti hémolytique.
 - Une présentation des résultats et discussion.



Synthèse
Bibliographique

I.1. Physiologie de l'oxydation

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobies. Toutefois, il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou les espèces oxygénées réactives (EOR) (ou ROS, pour réactive oxygen species) et les espèces réactives de l'azote ERN) (Pincemail et al., 2002). A faibles doses, les EOR sont très utiles pour l'organisme, ils jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tels que la transduction du signal, l'entretien et le fonctionnement de l'organisme, et du mouvement cellulaire.

Les ERO participent à la signalisation cellulaire (Koechlin-Ramonatxo, 2006) et à la régulation de nombreux facteurs de transcription tels que l'API (Activator protein-1) et HSF1 (heat shock factor 1) qui activent des gènes dits «Protecteur pour la cellule ». Ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les « antioxydants » ou les « HSP » (Heat Shock Protein) contribuant aux processus de réparation et régénération cellulaire. Ces espèces participent aussi dans l'élimination des produits toxiques et la défense contre l'invasion des microbes et des virus, de même que contre les cellules tumorales.

Le radical oxynitrique (NO^{*}) joue un rôle dans la protection cardiaque, la régulation de la pression artérielle. L'anion superoxyde (O₂⁻) le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) , interviennent aussi dans la maturation, l'hyper activation des spermatozoïdes et leurs fusions avec l'ovocyte (Seifried et al., 2007). Les espèces réactives oxygénées et azotées participent aussi dans la différenciation cellulaire l'apoptose, l'immunité et la défense antimicrobienne. Ces espèces chimiques sont très instables, elles jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux (Fekikh, 2015) .

I.2. Physiopathologie de l'oxydation

Les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme à des doses excessives. Cette surproduction des EOR au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques, donne naissance au stress oxydant. Le stress oxydatif est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement les maladies cardio-vasculaires enfin la plupart des maladies dégénératives (Fendri et al., 2006) (Nagmoti et al., 2012).

I.3. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les EOR ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations (Berger, 2006). Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...) (Ouellet et al., 2007) et/ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques), un déséquilibre entre la production de radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelée stress oxydatif (Bacot, 2004) .

I.4. Radicaux libres et Stress oxydatif

I.4.1. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (molécules ou atomes) ayant un ou plusieurs électrons non appariés. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de leur tendance à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules voisines. L'espèce agressée devient à son tour radicalaire en initiant un processus de réaction en chaîne. Les EOR sont dotées d'une durée de vie qui est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde (REMILA ,2015) ce qui rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques (Fontaine et al., 2002). Les ERO sont électriquement neutres ou chargés (ioniques), incluent les radicaux libres de l'oxygène proprement dit et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^*$) (Bartosz, 2003, Nadour, 2015).

Tableau I: les espèces réactives oxygénées ERO (Fontaine et al., 2002, Nadour, 2015).

Espèces réactives oxygénées (ERO)	
Radicalaires	Non radicalaires
·OH radical hydroxyl	H ₂ O ₂ peroxyde d'hydrogène
RO· Radical alkyl	ROOH peroxyde organique
ROO· Radical peroxy	HOCl acide hypochloreux
O ₂ ⁻ Anion superoxyde	¹ O ₂ oxygène singulet
NO· Radical oxynitrique	ONOO ⁻ peroxy nitrite

I.4.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses anti oxydantes (Fontaine et al., 2002). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale (Ardailou, 2004), à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Berger, 2006). Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés biologiques, sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire, ils présentent trois phases principales ; provoquant enfin une perturbation de la cellule vivante (Seifried et al., 2007).

a- Une phase d'initiation : intervention d'un radical à l'exemple de l'hydroxyle OH en arrachant un atome d'hydrogène. Cette réaction est facilitée par la chaleur, les rayonnements ou les catalyseurs (métaux tels que Cu, Fe, Co.....) (Remila, 2015);

b- Une phase de propagation: formation d'un radical peroxyde (ROO•) en présence d'oxygène qui déstabilise une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturés AGPI et conduit à un hydroperoxyde lipidique (ROOH) et à un nouveau radical, assurant ainsi la propagation du processus dit en cascade (Remila, 2015) ;

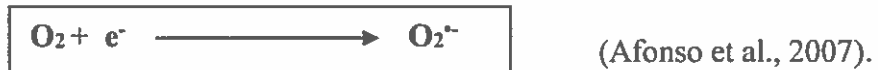
c- Une phase de terminaison, recombinaison de différents radicaux formés pour aboutir à des composés stables (Remila, 2015).

I.5. Nature et sources cellulaires des ERO

Les ERO se forment d'une manière parasitaire dans les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons ou la participation de l'oxygène. Des cellules et des tissus donnent naissance aux ERO soit par des réactions enzymatiques par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normal ou suite à une réponse à un stimulus spécifique (Serafini, 2006).

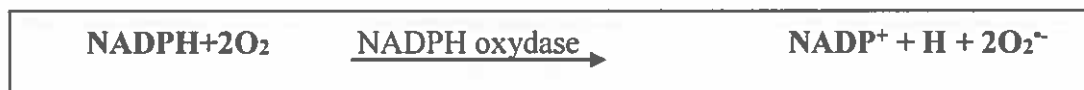
I.5.1. Le radical anion superoxyde

L'oxygène moléculaire est un radical qui possède deux électrons non appariés avec des spins parallèles, lui attribuant une stabilité relativement grande. Cependant, dans l'organisme, une partie de cet oxygène peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ; chef de file des EOR (Afonso et al., 2007).

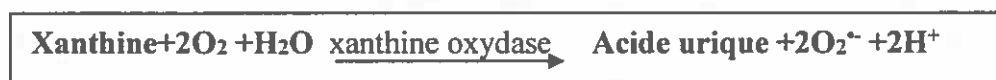


La source principale de ce radical est la chaîne respiratoire au niveau du complexe I (NADH /ubiquinone oxydoréductase) et du complexe III (ubiquinol /cytochrome c oxydoréduction).

D'autres chaînes de transport d'électrons (peroxysomes et microsomes) contribuent pareillement à la production du $O_2^{\bullet-}$ dans les cellules en aérobiose. Les cytochromes P450 et b5 de la chaîne de transport d'électrons des microsomes peuvent produire des EOR quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers (Aissat, 2015) la poussée respiratoire (respiratory burst) des polynucléaires neutrophiles constitue une source cellulaire importante de l'anion superoxyde qui est produit au niveau de la NADPH oxydase. Cette enzyme s'active lorsque la cellule phagocytaire est stimulée pour produire le $O_2^{\bullet-}$. Cette production est à l'origine de la synthèse de molécules de digestion phagocytaire comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite ($ClO^{\bullet-}$) (Fontaine et al., 2002) .



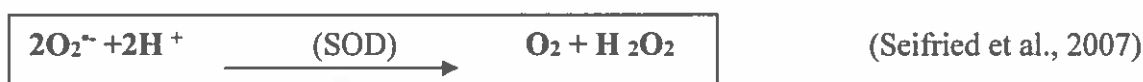
Le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante :



D'autres molécules peuvent être des substrats de réactions d'auto-oxydations (non enzymatique), comme le glucose, les monoamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) l'hémoglobine, conduisant également à la formation du superoxyde (Aissat, 2015, Bartosz, 2003).

I.5.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde, catalysé principalement par la superoxyde dismutase (SOD) :

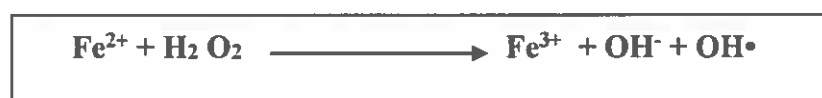


À côté de la SOD, il existe d'autres enzymes produisant H_2O_2 , comme les oxydase présentées particulièrement dans les peroxysomes. Cependant, certaines de ces oxydases comme la glycoxylate oxydase, la D-aminoacide oxydase peuvent catalyser directement la réduction divalente de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde, le foie est l'organe central de cette production. Les microsomes sont responsables dans 80% de la concentration d' H_2O_2 généré *in vivo* dans les sites hyperoxiques (Aissat, 2015).

L'absence de charge à sa surface rend cette EOR très lipophile et peu réactif en milieu aqueux, le peroxyde d'hydrogène peu néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production, il peut alors participer à la biosynthèse du radical hydroxyle (Gardès-Albert et al., 2003).

I.5.3. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi H_2O_2 associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton (Aissat, 2015).



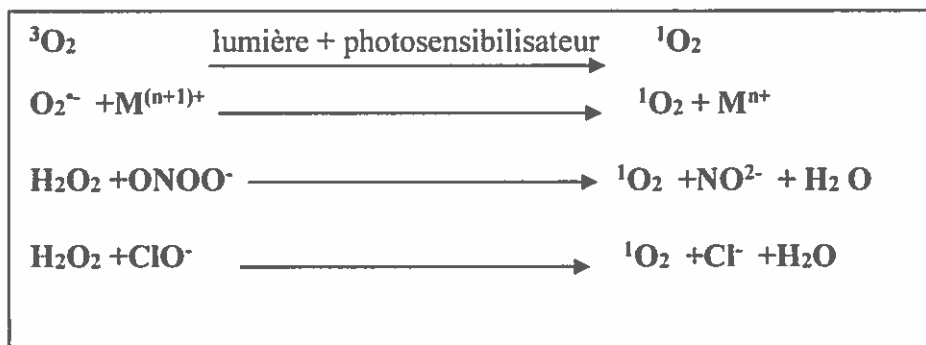
le H_2O_2 peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du OH^\bullet , selon la réaction d'Haber et Weiss.



D'autres voies de formation du OH^\bullet sont : la décomposition de l'acide peroxonitrique et la réaction de l'acide hypochloreux avec $\text{O}_2^{\bullet -}$. Avec une demi vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène, il réagit avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant dans son voisinage (protéine, lipide, ADN), il apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Gardès-Albert et al., 2003).

I.5.4. L'oxygène singulier

Pour l'oxygène moléculaire, l'état triplet (bi radical) est plus stable que l'état singulier, ainsi l'oxygène singulier fait partie des EOR. Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre diverses EOR ou en présence de la lumière, d'oxygène et de photo sensibilisateur comme la porphyrine, tel est le cas de la porphyrie erythro-poétique- congénitale (Nadour, 2015) :

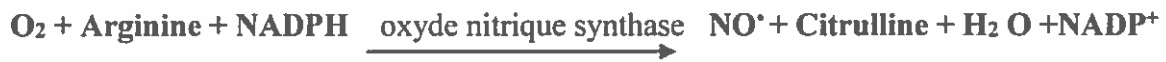


I.6. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'azote (ERN)

Les espèces réactives de l'azote renferment principalement le monoxyde d'azote (NO^\bullet), le peroxy-nitrite (ONOO^\bullet), le dioxyde de nitrogène (NO_2^\bullet) et le nitrosyl hydride (HNO).

I.6.1. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO^\bullet) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par l'oxyde nitrique synthase (NOS) selon la réaction suivante :



Cette production est physiologique, joue un rôle majeur dans la neurotransmission, la régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, et la régulation immune. Mais à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le $\text{O}_2^{\bullet -}$ pour former un puissant oxydant le peroxyde nitrite (ONOO^\bullet) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO_2 et le OH^\bullet . Il est formé dans les tissus biologiques par la nitrique oxyde synthase « NOS » qui oxyde l'arginine en citrulline.

Le NO^\bullet est un oxydant faible, sa durée de vie est très courte, et la voie de transformation la plus dangereuse du NO^\bullet est sa réaction avec l'anion $\text{O}_2^{\bullet -}$, cette réaction conduit à la formation de peroxyde nitrite ONOO^\bullet (Aissat, 2015, Bartosz, 2003, Migdal and Serres, 2011).

I.6.2. Le peroxyde nitrite (ONOO^\bullet)

Il réagit avec les fonctions thiols, les lipides, les bases nucléiques et les protéines. C'est un agent nitrant actif qui agit sur les cycles aromatiques (tyrosine et tryptophane). Quand il est protoné, il conduit à la formation des oxydants très forts comme le $\cdot\text{OH}$ et le $\text{NO}_2 \cdot$ (RIOUX, 2009).

A côté des sources cellulaires des ROS et ERN il existe des facteurs exogènes qui peuvent participer directement ou indirectement dans la génération de ces espèces réactives dans les systèmes biologiques, parmi lesquels les radiations ionisantes et non ionisantes, les gaz toxiques comme l'ozone O_3 , les toxines, les drogues, les pesticides, les métaux lourds, certains conservateurs alimentaires comme le dioxyde de sulfure, le tabagisme, les alcools (Favier, 2003).

I.7. Implications pathologiques du stress oxydatif

En raison de leur réactivité élevée, les espèces réactives interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme (Ardaillou, 2004). Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré. En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes : l'athérosclérose, le cancer, les maladies métaboliques, (Ardaillou, 2004) tel que le diabète (le phénomène de glyco-oxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine). La Cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré (Migdal and Serres, 2011), la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires, maladie de Parkinson, les inflammations gastro-intestinales, ulcères, les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Afonso et al., 2007, Berger, 2006).

I.8. Cibles biologiques de radicaux libres

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell, 2006).

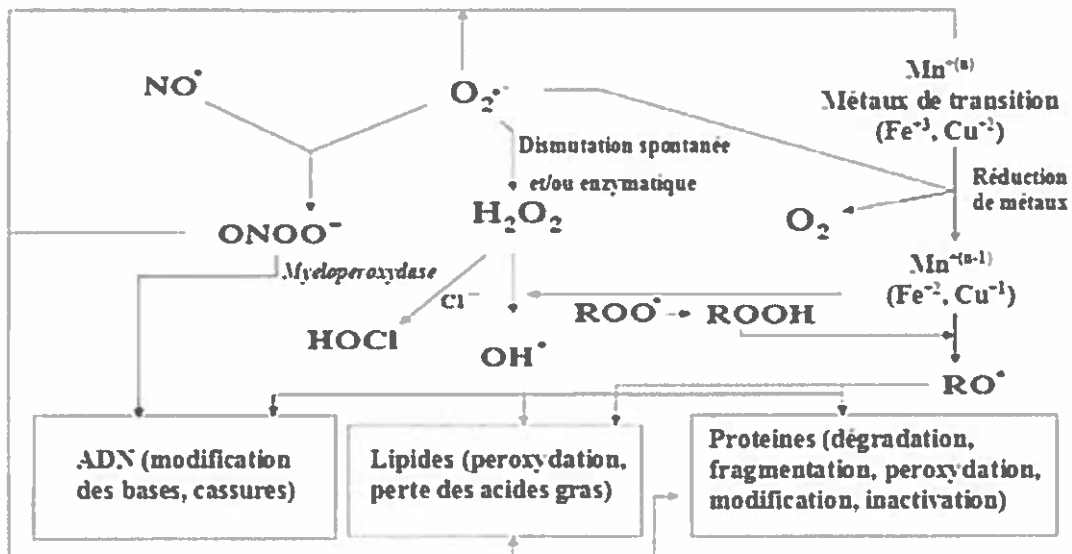


Figure 1 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR (Sounougou,2012).

1. Les lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des EOR en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières. Les produits d'oxydation formés peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires , libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire (Edmond, 2003, Nadour, 2015) .

2. Les protéines

Les acides aminés des protéines sont la cible des EOR, soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne. Si la majorité des acides aminés peuvent être oxydés par les EOR, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles. L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra /intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigéniques et leurs activités. Les protéines modifiées deviennent

généralement plus sensibles à l'action des protéases et vont subir une dégradation protéolytique (Favier, 2003, Nadour, 2015).

3. Les acides nucléiques

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR, ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées (Afonso et al., 2007). Les EOR ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres. Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Nagmoti et al., 2012, Valko et al., 2006).

I.9. Les antioxydants

Pour limiter les effets délétères des espèces réactives radicalaires et non radicalaires et leurs conséquences physiopathologiques, l'état redox intracellulaire est équilibré par des systèmes antioxydants. Ces systèmes antioxydants sont soit des molécules qui captent rapidement les espèces réactives, soit des systèmes enzymatiques qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes en molécules stables. Donc selon le mode d'action de ces systèmes, nous distinguons deux classes d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. (Laguerre et al., 2007).

Tableau II : Les différentes types d'antioxydants (Sounougou,2012).

Antioxydants	Exemples
Caroténoïdes	β -carotène, lycopène, lutéine
Enzymes	SOD , catalase , GPx
Glutathion	Glutathion
Minéraux	Zinc, sélénium, cuivre
Les composés phénoliques	Quercétine, catéchine
Vitamines	α -tocophérol,acide ascorbique

I.9.1. Antioxydants enzymatiques

L'un des systèmes de défense antioxydants enzymatiques est constitué de trois enzymes : le superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase GSH-Px et la catalase. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Afonso et al., 2007).

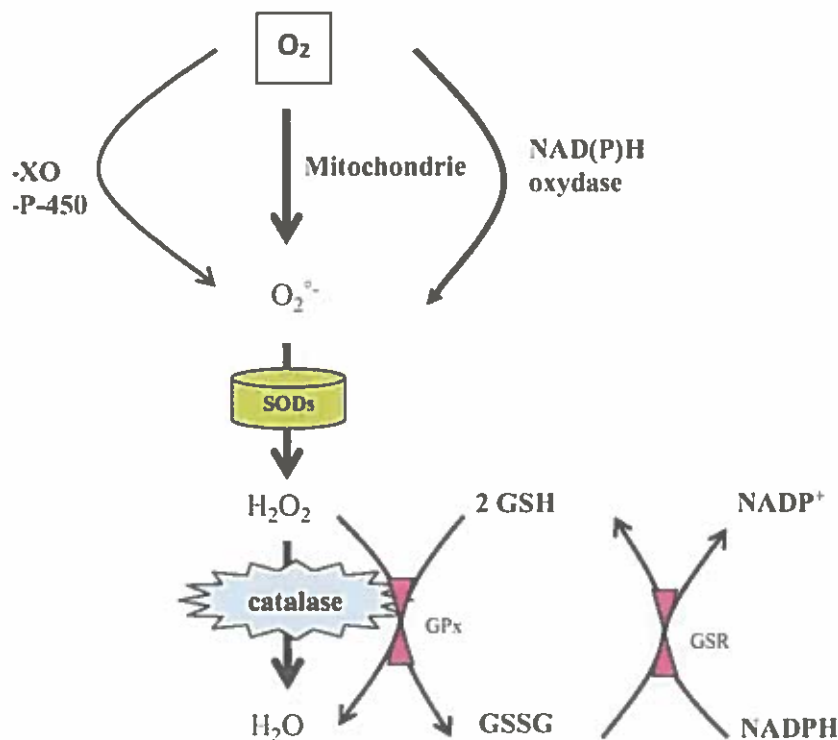


Figure 2: Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres

(Afonso et al., 2007).

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, le glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases. La plupart de ces enzymes, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003, Seifried et al., 2007).

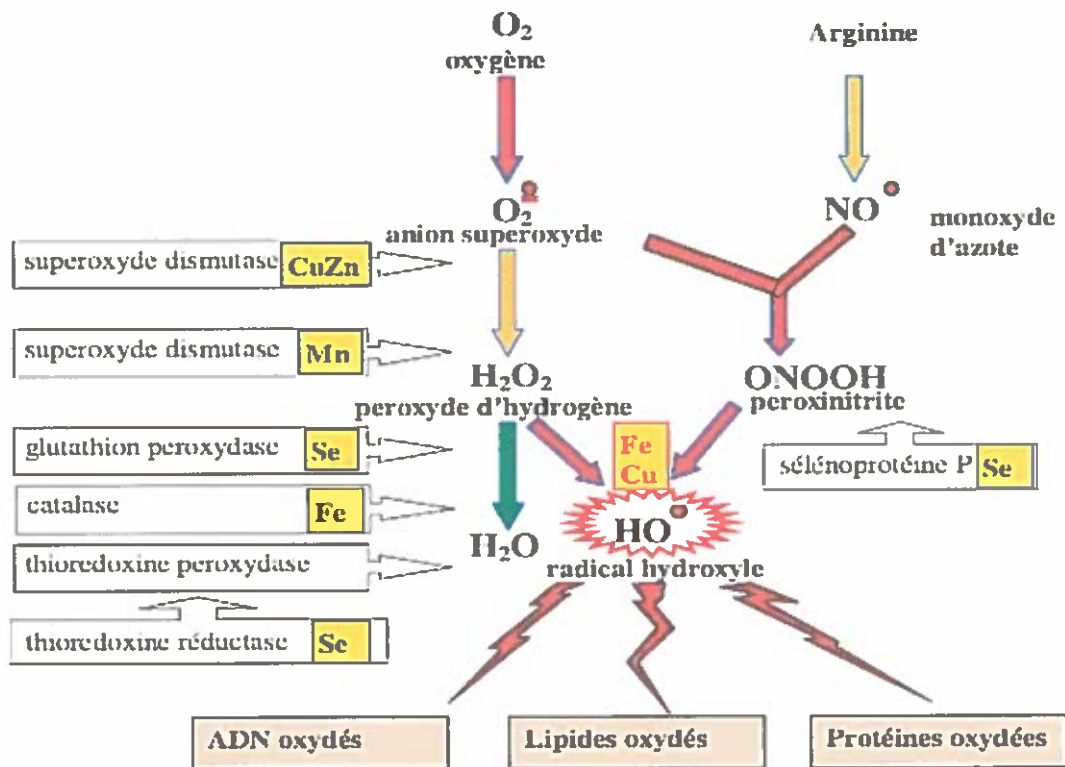


Figure 4 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

II.1. *Pinus halepensis* Mill.

II.1.1. Origine et description botanique

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis*), décrit par Miller en 1768 (Cheikh-Rouhou et al., 2006), est une espèce pionnière et expansionniste (Fernandez et al., 2009) circumméditerranéenne (Maestre et al., 2003). *Pinus halepensis* Mill. appartenant à la famille des *Pinacées* (Cheikh-Rouhou et al., 2006). Ce genre comprend 120 espèces dans le monde (Fekikh, 2015). C'est un arbre qui atteint 6 à 20 m de hauteur (Kadri, 2014), appelé Tayda (Fekikh, 2015) ou encore Snober (Khabbach et al., 2012).

L'écorce est grise-argenté puis rougeâtre, à bourgeons non visqueux. Les feuilles sont de 2 dans chaque gaine, longues de 5-10 cm les cônes oblongs-coniques aigus, longs de 8-12 cm, rouge-brun, à pédoncule très épais, constamment réfléchis écailles à écusson presque plane, faiblement caréné. La graine est ovoïde bombée à trois angles, de couleur grise de 0,6 cm de long appelée "Zkoukou" dans les régions d'Afrique du Nord C'est l'organe de reproduction (Kadri, 2014).



Figure 5: *Pinus halepensis* Mill.

II.1.2. Taxonomie

Tableau III: systématique de *Pinus halepensis* Mill (Kadri, 2014).

Classification	Espèce
Embranchement	Phanérogames
Sous –Embranchement	Gymnospermes
Ordre	Pinales
Famille	Pinaceae
Genre	<i>Pinus</i>
Sous- Genre	<i>Diploxylon</i>
Espèce	<i>Halepensis</i>

II.1.3. Répartition géographique

Le pin d'Alep domine les écosystèmes forestiers dans les zones semi-arides (Bakšić et al., 2017) , sèches et l'hémisphère sud à cause d'une grande rétention de l'eau (Guedira et al., 2012, Maestre et al., 2003) avec 6 ,8 millions d'ha au monde (Bakšić et al., 2017) .

En plus de son aire de répartition naturelle, cette espèce a été largement utilisée dans les projets de boisement au cours du XXème siècle (Maestre and Cortina, 2004) .Il écarte le bassin méditerranéen comprenant des îles. Sa gamme continentale s'étend d'Afrique du nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) et de moyen-est (Turkey ,Syrie, du Liban, de la Jordanie, de Palestine), jusqu'à l'Europe méditerranéenne méridionale (Grèce, Croatie, Italie , France orientale et Espagne orientale) (Djerrad et al., 2015, Rathgeber, 2002).En Algérie , il se répartie sur 900 000 hectares (Kadri et al., 2015).

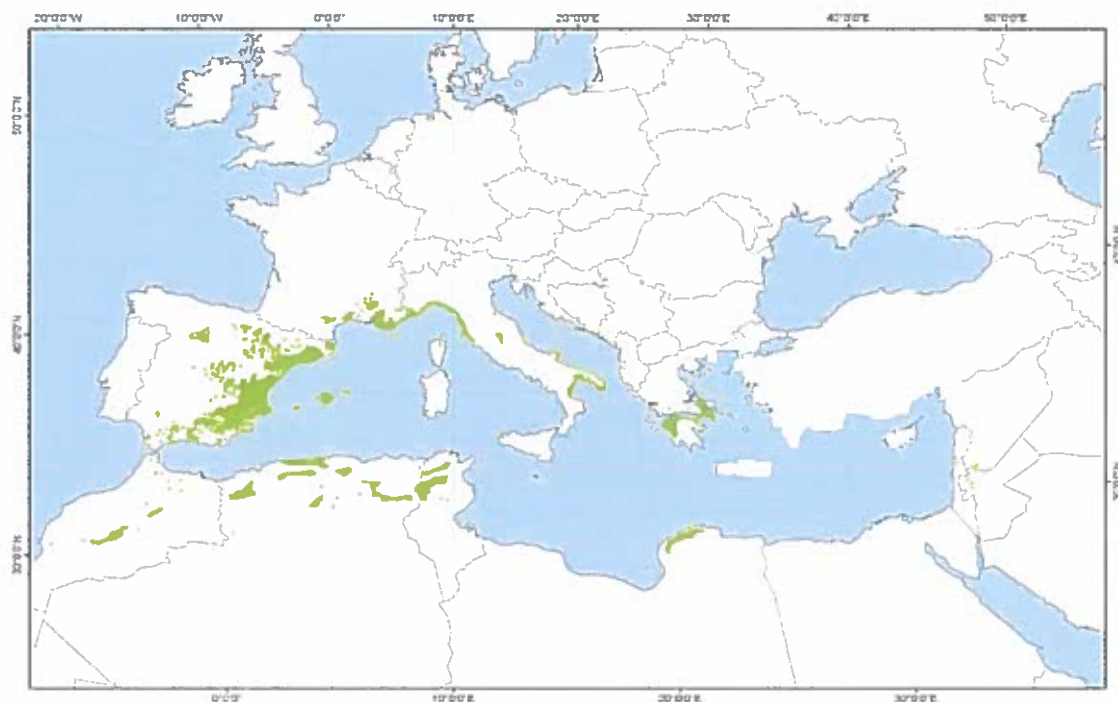


Figure 6: Répartition de Pin d'Alep dans le bassin méditerranéen (Fekikh, 2015) .

II.1.4. Composition chimique

➤ Racine et aiguille

Dans les extraits de racine et d'aiguille de *P.halepensis* , 59 composés ont été identifiés appartenant aux différents groupes phytochimiques : composés phénoliques (50%), acides gras (44%), monoterpènes (5%), et sesquiterpènes (1%) (Fernandez et al., 2009).

➤ Graines

L'étude de la composition de la graine de *P. halepensis* est menée et plusieurs composés de ont été identifiés.

Tableau IV : La composition chimique des graines de pin d'Alep (Kadri, 2014) .

Composition	Pourcentage %
Protéines	22,7
Huile	43,3
cendres	8,3
Potassium, Magnésium et Calcium	1
carbohydrates totaux	5,7

II.1.5. Utilisation de *P. halepensis* Mill.

Ces produits occupent une place importante dans l'économie surtout le bois. Ils sont utilisés dans la menuiserie, la charpente ordinaire, la caisserie, des emballages et du coffrage (Hamrouni et al., 2011) sans oublier de rappeler la bonne aptitude du bois aux utilisations papetières et à la fabrication de panneaux de particules (Kadri, 2014). En plus de ces produits, il existe une très grande demande en graines de pin d'Alep (Hamrouni et al., 2011). Une source importante de la résine qui est considérée comme étant le plus ancien des produits forestiers non ligneux, appelée « produits de Navals Stores » (Ghanmi et al., 2007).

Des pignons d'Alep sont traditionnellement employés dans l'ensemble de la Tunisie, et d'autres pays islamiques, pour préparer un pudding doux des pignons moulus, sont appelés le 'Assida- Zgougou'. Récemment, il a été également utilisé comme ingrédient en glaces et en sucreries (Fekih et al., 2014, Cheikh-Rouhou et al., 2006).

Il est également employé dans le fourrage, assaisonnement en nourriture et en boissons. Néanmoins, les graines de cette espèce présentent de nombreuses vertus culinaires où elles agrémentent les pains traditionnels, les salades, le riz et les poissons (Rathgeber, 2002).

Cette espèce est plus souvent utilisée en cosmétique pour ses aiguilles aromatiques riches en huiles essentielles entrant dans la fabrication parfumerie et savonnerie (Fekih et al., 2014, Rathgeber, 2002). La térébenthine est huile essentielle qui entre aussi dans la production des produits de nettoyage (Fekih et al., 2014).

Le pin d'Alep est exploité récemment dans le domaine agricole ainsi il a fait l'objet de plusieurs projets de boisement contre l'érosion dans le monde tel que le barrage vert en Algérie (Maestre and Cortina, 2004).

Pinus halepensis Mill. est riche en matière organique 89.7%, ainsi une teneur élevée en Carbone 51.9 %, grande capacité de changement cationique et une grande conductivité électrique donc peut être utilisée comme chambre de culture pour la multiplication des végétaux surtout des espèces exigeantes afin de produire des plantes de très haute qualité morpho-physiologiques (Ghanmi et al., 2007).

La résine de pin, depuis on extrait l'essence de térébenthine qui est un rubéfiant et balsamique, efficace dans les catarrhales du système respiratoire : la grippe, la sinusite et les rhumatismes (Fekikh, 2015).

II.1.6. Propriétés biologiques du genre *Pinus*

Les propriétés bénéfiques de ce genre en général se rapportent principalement aux propriétés pharmacologiques de leurs composés à savoir: les activités anti-inflammatoires antioxydants antinéoplasiques et immunomodulatrices (Kadri, 2014). Les graines comme un remède naturel pour plusieurs maladies incluant un effet sur la fatigue et le vieillissement (Kadri et al., 2014). Il a été aussi démontré qu'il est un puissant antiseptique ; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires (González-Tejero et al., 2008).

Les études menées sur des extraits d'aiguilles ont démontré plusieurs activités biologiques : antifongiques, anti bactériennes et anti-inflammatoires ainsi anticancéreuses, ou cette dernière étant plus intense pour les extraits récupérés à partir des cônes (Kadri et al., 2013).

L'activité anti-oxydante de deux espèces (*Pinus koraiensis*) et (*Pinus sibirica* Du Tour) a été évaluée par l'inhibition *in vitro* des radicaux libres (DPPH, OH- et O₂-) ainsi la viabilité cellulaire (Kadri et al., 2013). L'activité anti-oxydante *in vivo* des polyphénols des graines de *Pinus koraiensis* a été également déterminée, l'extrait peut inhiber fortement le vieillissement des souris en renforçant l'activité de la SOD, en diminuant le MDA contenu et en augmentant le contenu en GSH. Il a été constaté aussi que l'extrait peut inhiber puissamment les dommages oxydant induits par les rayons (Kadri, 2014).

Les lipides neutres, glycolipides et les phospholipides des graines de *P. halepensis* Mill. peuvent lutter contre le cancer en empêchant l'angiogenèse tumorale (Kadri et al., 2014).

Il est aussi utilisé soit en tant qu'additif alternatif en nourritures, pharmaceutiques et antioxydants et dans des préparations de produit de beauté (Djerrad et al., 2015).

La térébenthine est une huile essentielle issue de *P. halepensis* Mill. largement employée dans diverses industries de peinture, chimie, pharmacie et alimentation et la colophane (Ghanmi et al., 2007).

Une étude de l'effet de la térébenthine au Maroc a montré son efficacité contre les bactéries extrêmement pathogènes telle que *Staphylococcus aureus* et les champignons tel que *Aspergillus niger* ceci grâce à sa richesse en pinènes (Fekih et al., 2014, Ghanmi et al., 2007).

Les huiles essentielles de *P. halepensis* Mill d'Algérie étudiées ont montrés un pouvoir antioxydant élevé (Djerrad et al., 2015).

L'huile de pin 'Alep est une source potentielle appliquée comme antimicrobien dans les industries alimentaires contre *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* et *Klebsiella pneumoniae* (Fekih et al., 2014). Utilisée aussi dans la prévention des accidents cardiovasculaires et du cancer, un potentiel protecteur et thérapeutique en pathologies dommage-connexes oxydantes (Cheikh-Rouhou et al., 2006).

Les lipides de graine étudiée sont riches en acide linoléique, qui a un salubre effet sur des lipides de sang, abaissant la tension artérielle et le cholestérol. Ils constituent une bonne alternative source des acides gras essentiels et ont pu contribuer à la combinaison d'ingestion diététique des éléments minéraux (Cheikh-Rouhou et al., 2006) peuvent être aussi nécessaire pour un régime alimentaire équilibré (Kadri et al., 2015).

Une activité antiinflammatoire sous l'effet des principes actifs présents dans les graines sur l'activité de la cyclooxygénase, la production de prostaglandine E2 et sur la synthèse d'oxyde nitrique. Il a été démontré aussi que les graines de pin ont un effet sur la régulation du cancer liés aux protéines. Ces actions pharmacologiques attribuées aux graines de pin sont liées à la présence à la fois des substances bioactives lipophiles et hydrophiles : les terpènes, les acides gras et triacylglycérides, des vitamines, des polyphénols, des acides aminés et des macro/oligoéléments (Kadri, 2014).

II.2. *Inula viscosa*

II.2.1. Origine et description botanique

Inula viscosa (synonyme *Dittrichia viscosa*) viendrait du grec : Inéo qui signifie : je purge et *Viscosa* signifie : visqueuse. *Dittrichia viscosa* appelée magramane en Afrique de nord, appartenant à la famille des *Compositae* (Hernández et al., 2007), ce genre renferme 100 espèces (Chahmi et al., 2015).

C'est une herbacée annuelle, vivace, glanduleuse à odeur forte et ligneuse dans sa partie inférieure. Elle apparaît sous forme de buissons de 0.5 à 1 mètre de hauteur et présente de nombreux capitules à fleurs jaunes au sommet de la tige (Side Larbi, 2016). Les feuilles sont simples, dentées et Souvent couvertes de glandes sécrétant une substance collante (Danino et al., 2009). La floraison est en automne. Les fruits sont des akènes (Side Larbi, 2016).

Figure 7: *Dittrichia viscosa*

II.2.2. Taxonomie

Tableau V : Systématique de *Dittrichia viscosa* (Side Larbi, 2016).

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotyledones
Sous-classe	Gamopetales
Ordre	Campunulales
Famille	Compositae
Genre	<i>Inula</i>
Espèce	<i>viscosa</i> L. Aiton
Synonyme	<i>Dittrichia viscosa</i> L.

II.2.3. Ecologie et répartition géographique

Cette plante cosmopolite est très répandue dans tout le bassin méditerranéen surtout dans le nord d'Algérie, poussant aux bords des cours d'eau, sur les prairies humides et sur les sols salés (Wang et al., 2004).

II.2.4. Composition chimique

Un grand nombre d'espèces appartenant au genre *d'Inula* ont fait l'objet d'études de leur composition chimique où se sont identifiés de nombreux métabolites secondaires à savoir les terpènes particulièrement lactones, les flavonoïdes, les glycolipides et des dérivés d'acides anthraniliques (Chahmi et al., 2015) .

Parmi les composés présents dans cette espèce, nous retenons les sesquiterpènes et la tomentosine (Mamoci et al., 2011), les triterpènes, les esters de monoterpène, les esters phenylethanoides, (Máñez et al., 2007). Egalement trois flavonoïdes ont été isolés la rhamnocitrine, 7 O – méthylaromadendrine et 3 O - acetylpadmatine ; et un glycosyl-diacylglycérol (Hernández et al., 2007, Máñez et al., 2007) .

II.2.5. Utilisation et propriétés biologiques

Dittrichia viscosa est utilisée en partie ou en totalité sous plusieurs formes, poudre, infusion, tisane et cataplasme.

Dans la région du bassin méditerranéen, elle était pour longtemps utilisable comme un anti-inflammatoire, antiseptique (Hernández et al., 2007), antipyrétique et antiphlogistiques (Aşkin Çelik and Aslantürk, 2010). En Espagne elle est utilisée pour le traitement de désordre gastroduodéal (Chahmi et al., 2015) et un antiulcérogène (Wang et al., 2004). En Jordanie et dans le moyen orient, la médecine traditionnelle attribue à *D.viscosa* plusieurs utilités telles que : antihelminthique, expectorant, diurétique, traitement de bronchite (Haoui et al., 2015). Aussi utilisée contre la tuberculose, l'anémie et les douleurs rhumatoïques ainsi que pour mûrir les abcès. Elle est aussi connue comme sédatif de la toux et des spasmes bronchiques ; elle corrige l'atonie de l'estomac et de l'intestin et abaisse la fièvre (Chahmi et al., 2015) .

La partie aérienne de cette plante est utilisée sous la forme de décoction dans le traitement du diabète (Chahmi et al., 2015), l'hypertension et la néphropathie. Elle est aussi prescrite comme un agent promoteur dans l'induction de l'avortement et la stérilité des femelles (Wang et al., 2004).

Les racines de *D. viscosa* sont employées en régime alimentaire améliorant l'appétit (Haoui et al., 2015) .

Les études menées sur les différents extraits de *D. viscosa* ont montrées la présence d'une activité biologique variable citant :

L'activité anti-inflammatoire sous l'action de certains sesquiterpènes : l'Inuviscolide de lactone et l'acide salicylique inhibent la sécrétion des enzymes pro-inflammatoires telles que l'élastase, la cyclooxygénase-1 et la phospholipase sécréteuse A2 (Hernández et al., 2007). En outre, il réduit l'infiltration et la dégranulation de leucocyte de peau. Ils agissent aussi sur biosynthèse de leucotriènes et commandent les interactions neuroniques entre les glucocorticoïdes (Hernández et al., 2001) (Máñez et al., 2007).

Elle est aussi connu pour son pouvoir antifongique et antibactérien sur des bactéries Gram+ et Gram- (Wang et al., 2004). Une lactone de sesquiterpène a été isolé de *D. viscosa* et identifié s'est avéré très active contre: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* et *Trichophyton entagrophytes*, *Aspergillus* spp. En outre, le meilleur effet est signalé sur la germination de *Microsporum laxa* et *Mioicrosporum fructigena* (Mamoci et al., 2011).

Les terpénoïdes de cette plante ont un effet inhibiteur sur les micro-organismes phytopathogène (Stavrianakou et al., 2006). Comme il a été démontré possédant un pouvoir abortif due à l'inhibition de l'implantation de zygote et une activité aulétique (Al-Dissi et al., 2001, Aşkin Çelik and Aslantürk, 2010).

Les activités cytotoxiques, génotoxique et antivirale de cette plante ont été mise en évidence (Abad et al., 2000)

La quercétine naturelle isolée de cette espèce est prometteuse en tant qu'agent anticancéreux et antimicrobiens (Talib et al., 2012).

Les extraits de leur feuilles ont été examinés pour leur activité sur les nématodes quoique l'extrait formulé ait été efficace dans les expériences de lutte contre les poux (Mamoci et al., 2011).



**Partie
Expérimentale**

III.1. Matériels utilisés

Matériels	
Verrerie	-Eprouvettes -Erlenmeyer - Béchers -Fioles -Tubes à essai -Flacons
Autres	-Micropipette réglable -Barreaux magnétiques -Spatule -Tubes coniques -Papier aluminium -Pissette -Pince -Portoirs
Appareillage	Marque
pH metre	HI2211ph10RP meter
Balance analytique	OHAVS
Agitateur magnétique	Hot plate stirrer
Bain marie	nuve batch/20nb
Hotte	CRURA670
Centrifugeuse	EZ Swing 3K
Spectrophotomètre	Sp-3000nano
Autoclave	Wise clave
Réfrigérateur	Maxipower
Etuve	venticell
Vortex	Nahita
Ultrasonicateur	
Microonde	

III.1.2. Réactifs et consommables

Le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) , acide gallique , méthanol, éthanol ,bicarbonate de sodium (Na₂CO₃) , chlorure d'aluminium (AlCl₃) ,Folin-ciocalteau , catéchine, quercétine, butyl hydroxytoluène (BHT), ferricyanure de potassium (K₃ Fe(CN₆)), acide trichloroacétique (TCA) , trichlorure de fer (FeCl₃), eau oxygénée(H₂O₂), sulfate de fer (FeSO₄) ,eau distillée ,hydrogénophosphate disodique (Na₂HPO₄), sodium dihydrogéné phosphate (NaH₂PO₄) , chlorure de potassium (KCl), hydroxyl de sodium (NaOH).

III.1.3. Matériel biologique

Le sang a été récupéré du centre de transfusion sanguine de l'hôpital de Mohamed BOUDIAF, Bouira à partir des volontaires sains et qui ne présente aucune maladie ou un déficit en facteur de coagulation. Le sang a été recueilli dans des tubes héparinés puis a été transporté directement au laboratoire dans une glacière puis conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

III.1.4. Matière végétale

III.1.4.1. Présentation de la zone d'étude

Le parc notionnel de Djurdjura a été créé le 23 juillet 1983, il s'étend sur 18 550 ha. Ce parc renferme 1 242 espèces végétales, essentiellement de belles futaies millénaires de cèdre de l'Atlas. On y trouve également des peuplements endémiques notamment de pin noir (Boutabia et al., 2015).

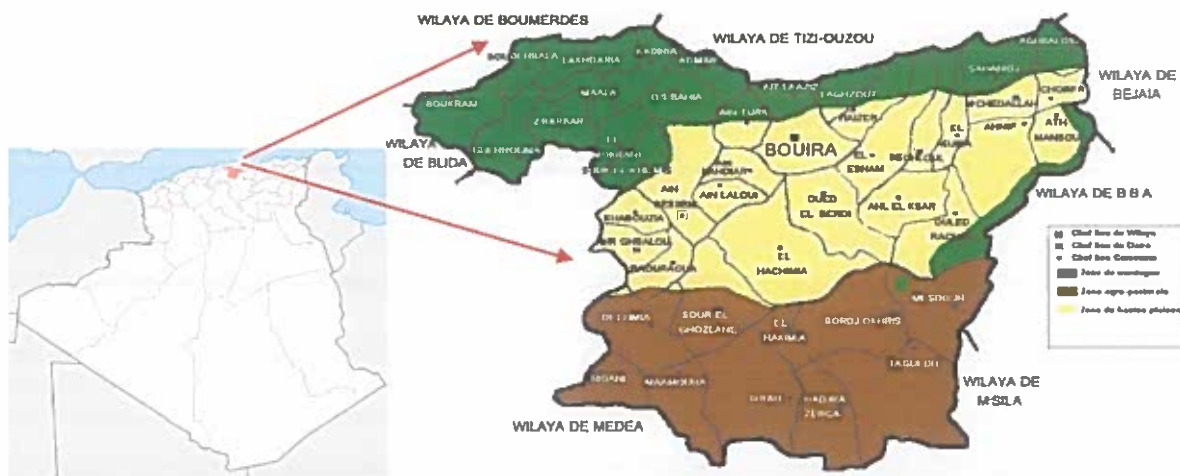


Figure 8: Carte géographique de la wilaya de Bouira.

III.1.4.2. Préparation des échantillons

Le choix des deux plantes s'explique d'une part, par leur originalité peu ou presque pas d'études menées sur leur activité biologique particulièrement antioxydante et anti-hémolytique et d'autre part, par leur efficacité dans la médecine traditionnelle vis-à-vis différentes maladies.

Les feuilles de *Dittrichia viscosa* ont été récoltées durant le mois de janvier d'Ah-el kser wilaya de Bouira, quant aux cônes de *Pinus halepensis* Mill. ils ont été récoltés du Parc national de Djurdjura entre les mois de Février et Avril. Leur identification botanique a été effectuée par un Botaniste de l'université de Bejaïa et un autre de l'université de Bouira.

Les cônes *P. halepensis* Mill. ont été mis dans de l'eau chaude pour faire dissoudre la résine en provoquant l'ouverture des cônes ce qui permettra la récupération des graines. Ensuite, les échantillons ont été lavés pour éliminer les impuretés. Tandis que le séchage a été effectué en deux étapes, un prés séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière pour éliminer l'excès d'eau et un autre dans l'étuve ventilée à 40 C° pendant 48 heure. Puis, elles ont été broyées et tamisées pendant 10 min. Une fine poudre homogène de 125 µm de diamètre a été récupérée et stockée à sec.

III.2. Méthodes

III.2.1. Extraction des polyphénols totaux

L'extraction a été faite au laboratoire de recherche de biochimie, biomathématique, biophysique et scientométrie (3BS), université Abdrrahmane Mira de Bejaia. La suite des tests a été effectuée au laboratoire département de biologie à l'université d'AKLI Mouhand Oulhadj, Bouira

Dans notre étude trois méthodes ont été sélectionnées et effectuées selon le protocole de (Dahmoune et al., 2015) pour *D.viscosa* (figure 9) et une extraction par macération pour *P.halepensis* Mill. selon le protocole de (Ferreira et al., 2006) (figure 10) avec certaines modifications.

III.2.1.1.Extraction conventionnelle (EC)

Dans un erlenmeyer de 250 ml, 2 g de poudre de *D. viscosa* ont été solubilisées avec 100 ml d'éthanol à 50% (v/v), puis a été placé dans un agitateur magnétique à 110 g pendant 2 h à 60° C.

III.2.1.2.-Extraction assistée par micro-onde (MAE)

Dans un ballon conique de 250 ml, 2g de poudre de *D. viscosa* ont été mélangées avec 90 ml de la solution d'éthanol à 45% (v/v) puis placé dans un micro-onde pendant 60 secondes. Le ballon contenant l'extrait a été refroidi à température ambiante pendant 5 min.

III.2.1.3. Extraction assistée par ultrasons (UAE)

Dans un ballon conique de 250 ml, 2g de poudre de *D. viscosa* préalablement solubilisée dans 60 ml de la solution d'éthanol à 30% (v/v) puis placé dans l'ultrasonicateur pendant 14 min. Le contrôle de la température est ainsi effectué en plongeant un thermocouple à l'intérieur de ballon (27° C).

III.2.1.4. Macération

20 g de poudre issue de la graine de *P. halepensis* Mill. ont été mélangés avec 200 ml d'eau distillée, à 60 C° pendant 15 min.

Les extraits ont été filtrés par un papier Wattman de 45μ. Les filtrats de *D. viscosa* ont ensuite suivies une évaporation dans une étuve ventilée pendant 2 à 4h afin d'éliminer l'éthanol. Puis les quatre filtrats ont subi une lyophilisation pour avoir des extraits en poudre et ont été conservés jusqu'à leur utilisation.

➤ Calcul de rendement d'extraction

$$r = m / M * 100$$

m : masse d'extrait après lyophilisation.

M: masse prise d'essai.

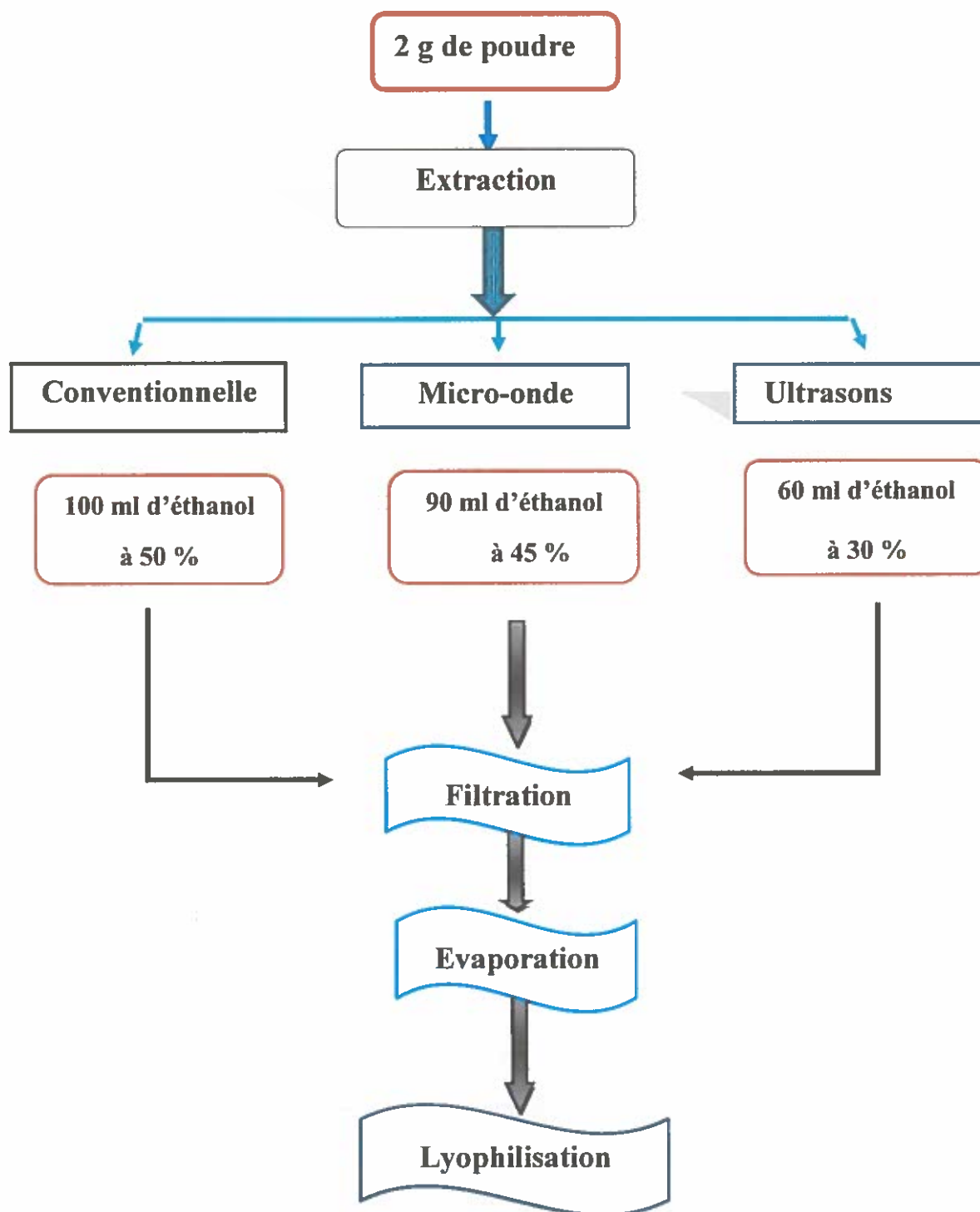


Figure 9: Schéma général de l'extraction des polyphénols de *D. viscosa* (Dahmoune et al., 2015)

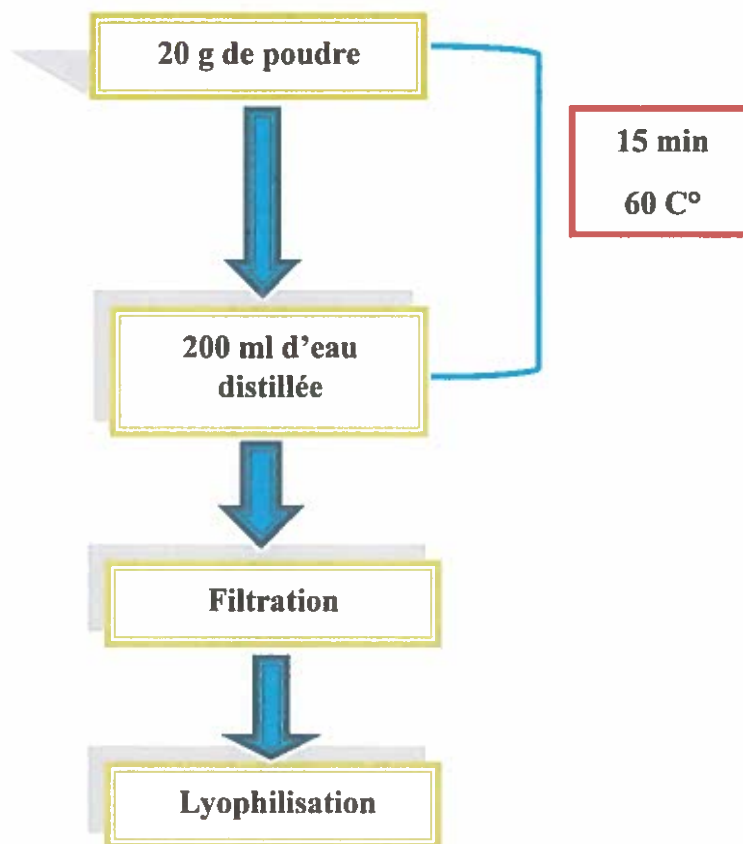


Figure 10: Schéma général d'extraction de *P. halepensis* Mill (Ferreira et al., 2006).

Remarque

Pour la suite ces abréviations indiquent :

DvMAE : *D. viscosa* axtraction assistée par microonde

DvUAE : *D. viscosa* axtraction assistée par ultrason

DvEC : *D. viscosa* axtraction conventionnelle

PH : *P. halepensis* Mill

III.2.2. Criblage phytochimique

III.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

Le dosage des polyphénols a été réalisé par le réactif de FolinCiocalteu en suivant le protocole de (Singleton and Rossi, 1965). Le Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃ PW₁₂ O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃ PMo₁₂ O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus fauchant de tungstène et de molybdène. Ce mélange présente un spectre d'absorption à 760 nm dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait (Aissat, 2015).

➤ Mode opératoire

500 µL de chaque extrait (DvMAE, DvUAE, DvEC et PH) préparé à 100 µg/ml ont été mélangés avec 2,5 ml de Folin Ciocalteu à 1/10. Incuber 2 min à l'obscurité ensuite 2 ml de bicarbonate de sodium (NaCO₃) à 7,5 % ont été ajoutés. Finalement une incubation à 50 C° pendant 15 min a été achevée puis la lecture de la densité optique (DO) à 760 nm a été réalisée.

Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (10 - 80 µg/ml) en suivant les mêmes conditions. La teneur en polyphénols a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait selon la formule suivante :

$$TP \text{ (mg/g)} = x \text{ (mg)} * D / m \text{ essai}$$

TP :taux de polyphénols totaux

X : masse de l'extrait calculé à partir de la courbe d'étalonnage

D : facteur de dilution

m: masse prise d'essai

III.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode du chlorure d'aluminium (AlCl₃) suivant le protocole de (Kadri, 2014). Les flavonoïdes forment des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont l'absorbance maximale est à 430 nm.

➤ Mode opératoire

2 ml de chaque extrait (DvMAE, DvUAE, DvEC et PH) à 300 mg/L ont été mélangées avec 1 ml d'AlCl₃ à 2 %. Les solutions ont été ensuite incubées pendant 10 min à température ambiante puis la lecture des DO à 430 nm a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage a été établie dans les mêmes conditions réactionnelles en utilisant la catéchine comme standard à des différentes concentrations (10- 80 µg/ml). La teneur de l'extrait en flavonoïdes a été déterminée en mg équivalent de catéchine par gramme d'extrait selon la formule suivante :

$$TF \text{ mg/g} = x \text{ (mg)} * D / m \text{ essai}$$

TF : taux de flavonoïdes

X :masse de l'extrait calculé à partie de la courbe d'étalonnage

D : facteur de dilution

m: masse prise d'essai

III.2.3. Activité biologique

La richesse de *D. viscosa* et de *P. halepensis* Mill. en métabolites secondaires nous a orienté à évaluer leur propriétés biologiques. Pour cela, nous nous sommes intéressés à évaluer *in vitro* :

-L'activité antioxydante des extraits.

-L'activité anti hémolytique.

A- Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

Une seule méthode n'est pas suffisamment fiable pour mettre en évidence l'activité des extraits isolés vis-à-vis des radicaux libres et avoir donner une efficacité précise (Dahmoune, 2013). Pour cela, trois méthodes de l'activité antioxydante ont été établies dans notre étude.

III.2.3.1. Evaluation par le test de DPPH

➤ Principe

Le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre, stable de couleur violet foncée. Il donne une absorption maximale à 517 nm. En présence d'un donneur d'hydrogène le DPPH est réduit en hydrazine (non radical) jaune. Dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Dahmoune, 2013) . En tant que radical libre stable, le DPPH peut être réduit en acceptant un électron ou un atome d'hydrogène, en présence d'un antioxydant.

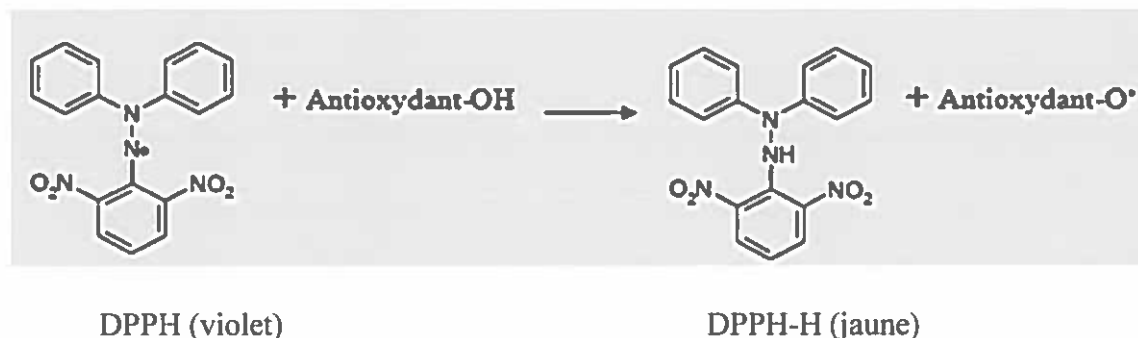


Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Side Larbi, 2016).

➤ Mode opératoire

Cette activité a été évaluée selon le protocole de (Djerrad et al., 2015). Une solution de DPPH à 60 μM a été préparée. Pour nos essais, 2,4 mg de poudre de DPPH ont été dissouts dans une fiole de 100 ml en l'ajustant avec du méthanol jusqu'au traits de jauge. L'absorbance de cette solution a été mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre avant de commencer les tests sur les extraits.

Les échantillons de (DvMAE, DvUAE, DvEC et PH) ont été préparés à différentes concentrations (100-500 mg /L) dans le méthanol. 25 μL de chaque dilution ont été ajoutés à

975 µL de la solution de DPPH (3 essais ont été effectués pour chaque concentration utilisée). Le milieu réactionnel a été incubé pendant 30 min à l'obscurité totale. La lecture des DO a été effectuée à 517 nm.

Le butyle hydroxy toluène (BHT) a été employé comme standard dont les mêmes conditions pour établir une courbe d'étalonnage. Le calcul de pourcentage de piégeage de radical de DPPH a été donné par la formule suivante :

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

Où :

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

A : l'absorbance de DPPH en présence de l'extrait.

III.2.3.2. Pouvoir réducteur : Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP)

➤ Principe

Le pouvoir réducteur d'un composé mesure sa capacité à transférer des électrons, cela indique son activité antioxydante. Le pouvoir réducteur des ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) est évalués spectrophotométriquement à 700 nm en suivant la transformation de la couleur jaune de la solution testée en un chromophore bleu-vert. L'augmentation de l'absorbance indique un grand pouvoir réducteur (Nadour, 2015).

➤ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur a été évalué selon le protocole de (Nadour, 2015). Les échantillons (DvMAE, DvUAE, DvEC et PH) ont été préparés à différentes concentrations (de 0,1 à 0,3 mg/ml) dans l'eau distillée. 100 µL ont été mélangés avec 250 µL de tampon phosphate salin (PBS à 0,2 M pH 6,6). Puis, 250 µL de ferricyanure de potassium à 1 % ont été ajoutés au mélange qui a été incubé pendant 20 min à 50°C°. Après incubation, les tubes ont été refroidis dans un bain de glace pendant 5 min. 250 µL d'acide trichloracétique à 0,61 mM ont été ajoutés afin d'arrêter la réaction suivi d'une douce agitation au vortex pendant une minute. Les milieux réactionnels ont été ensuite versés dans des tubes coniques et ont subis une centrifugation à 1000 g pendant 8 min. 250 µL de chaque surnageant ont été

mélangés avec 250 μL d'eau distillée et 50 μL de trichlorure de fer à 0,1 % puis ont été agités au vortex. Après 5 min d'incubation à température ambiante les DO ont été mesurées à 700 nm contre un blanc contenant tout le milieu réactionnel avec substitution de l'extrait par de l'eau distillée. La quercétine a été employée comme un standard préparée avec le même mode opératoire.

III.2.3.3. Mesure de l'activité antioxydante par réactivité avec le radical hydroxyle

L'activité antiradicalaire a été réalisé selon le protocole de (Nadour et al., 2015). Pour ce test une seule concentration de 100 mg/L des différents échantillons (DvMAE, DvUAE, DvEC, PH) a été employée, préparée dans l'eau distillée. 200 μL de chaque extrait ont été mélangés avec 200 μL d'une solution du sulfate de fer (FeSO_4) à 5 mM. Après homogénéisation au vortex, 200 μL de l'eau oxygénée (H_2O_2) à 1% ont été ajoutés. Puis, le mélange a été agité de nouveau au vortex pendant une minute avant l'incubation à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 1 h. A la fin, le milieu réactionnel a été dilué par 1 ml d'eau distillé et a été mélangé au vortex. Laisser agir pendant 5min, les DO ont été lues à 510 nm. L'acide ascorbique et utilisé comme standard.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité de radical hydroxyle a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle} = (A_0 - A_1 / A_0) * 100$$

A_0 : l'absorbance du mélange en absence de l'extrait.

A_1 : l'absorbance du mélange en présence de l'extrait.

B-Activité anti-hémolytique sur des cellules sanguines humaines

➤ Préparation des érythrocytes

La suspension érythrocytaire a été préparée selon le protocole de (Ebrahimzadeh et al., 2010). Le sang hépariné a été centrifugé à 1500 g pendant 10 min à 4° C. Le plasma et les couches de globules blancs ont été aspirés et éliminés. Les érythrocytes contenus dans le culot ont été repris dans le tampon PBS (à 0,2 M et pH 7,4) à 10 volumes. Après mélange par retournement, les échantillons ont été à nouveau centrifugés à 1500 g pendant 10 min à 4° C et les surnageants ont été éliminés à l'aide d'une micropipette. Le lavage du culot a été répété

3 fois dans les mêmes conditions. Les érythrocytaires lavés ont été suspendus dans le PBS (1 /1) , (v/v). Les érythrocytes ont été conservés à 4° C pendant 2 à 4 jours.

➤ **Mode opératoire**

Le test de l'activité inhibitrice de l'hémolyse a été réalisé selon le protocole décrit par (Nabavi et al., 2013) avec certaines modifications.

Une suspension érythrocytaire à 4 % a été préparée dans le PBS (0,2 et à pH 7,4). 2 ml de cette suspension ont été ajoutés à 0,5 ml de chaque extrait à tester (Dv MAE, Dv EC, Dv UAE PH) à différentes concentrations (0,25-0,5-0,75 et 1 mg/ml) déjà préparés dans le PBS. Puis, le milieu a été dilué en le complétant avec le PBS jusqu'à avoir 5 ml dans chaque tube à essai. Le mélange obtenu a été incubé pendant 5 min à température ambiante. 0,5 ml de H₂O₂ à 1M préparés dans du PBS ont été ajoutés pour induire la peroxydation des lipides membranaires des érythrocytes. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 4h dans un bain marie à 37° C. Ensuite, les échantillons ont subi une centrifugation à 1000 g pendant 10 min. Enfin, les surnageants obtenus dans chaque tube ont été aspirés et les lectures des DO ont été réalisées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Afin d'avoir une hémolyse totale (100 %) un contrôle contenant 2 ml de suspension érythrocytaire à 4 % ont été incubés avec 2 ml d'eau distillée.

L'acide ascorbique a été utilisé comme un standard dans les mêmes conditions.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule décrite en dessous :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = (Ac - Ae / Ac) * 100.$$

Dont :

Ac: c'est l'absorbance obtenue après hémolyse totale.

Ae : c'est l'absorbance obtenue en présence de l'extrait.

IV.1. Le rendement d'extraction

L'extraction des composés phénolique à partir des graines de *Pinus halepensis* Mill. et des feuilles de *Dittrichia viscosa* ont été réalisé en utilisant différentes méthodes à savoir : la macération simple pour le *P. halepensis* Mill. et la conventionnelle, microonde et ultrason pour *D. viscosa* . Les rendements d'extraction sont présentés dans la figure 12.

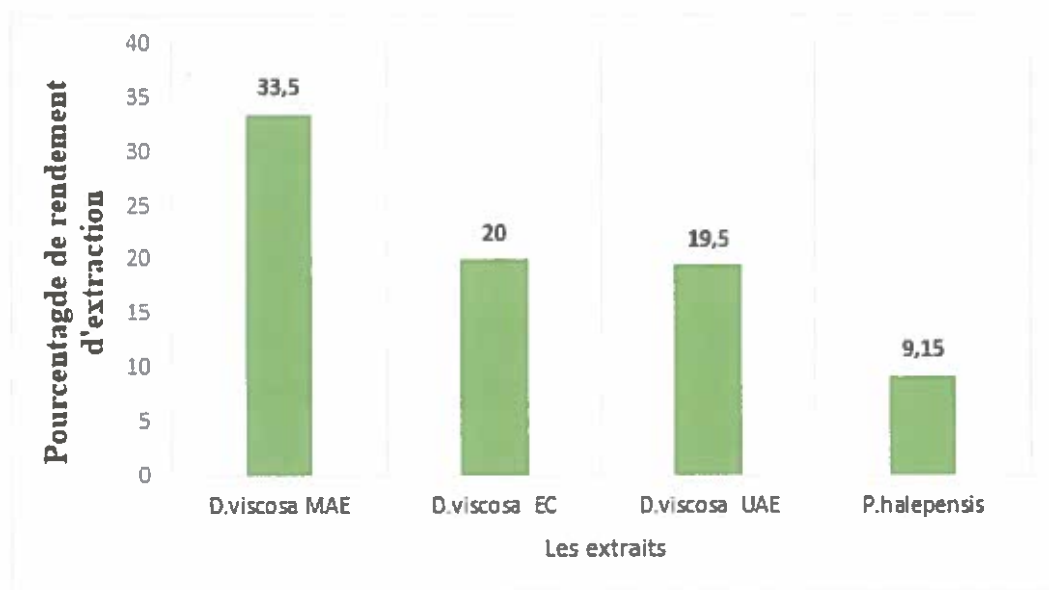


Figure 12: Rendement d'extraction des polyphénols totaux.

Le rendement de *D. viscosa* varie selon la méthode d'extraction, le pourcentage le plus élevé a été trouvé pour la méthode microonde avec 33, 5% suivi des deux autres méthodes, ultrasons et conventionnelle avec un rendement très proche entre les deux qui avoisine les 20%. Cette différence peut être expliquée par l'efficacité de procédé d'extraction incluant le temps, la température ainsi le solvant utilisé et sa polarité. La polarité des composants contenus dans la plante explique mieux cette différence de rendement.

Pour les graines de *P. halepensis* Mill. le rendement d'extraction de leur composés phénoliques a été trouvé plus faible (9,15%).

Ces résultats sont supérieurs à ceux trouvés dans des investigations antérieures menées sur les extraits de *D. viscosa*, en effet des rendements de 15% (Gökbulut et al., 2013), 10% (Abuhamdah et al., 2013) 13, 35% (Chahmi et al., 2015) ont été soulignés. En revanche, en utilisant du méthanol absolu, (Laghrifi et al., 2013) ainsi que (Chebouti et Meziou) ont trouvés un rendement beaucoup plus élevé avec des pourcentages respectifs de 44,95% et de 37,41% .

Ces résultats sont en concordance avec nos résultats. Pareillement au rendement, la différence de quantité dans les teneurs peut donc être expliquée par les conditions environnementales, la période de récolte ainsi que les protocoles expérimentaux utilisés (Lee et al., 2003).

IV.2. Criblage phytochimique

IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en fonction de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure 1 annexes). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche (mg EAG/ g sec). Les résultats sont présentés dans la figure 13.

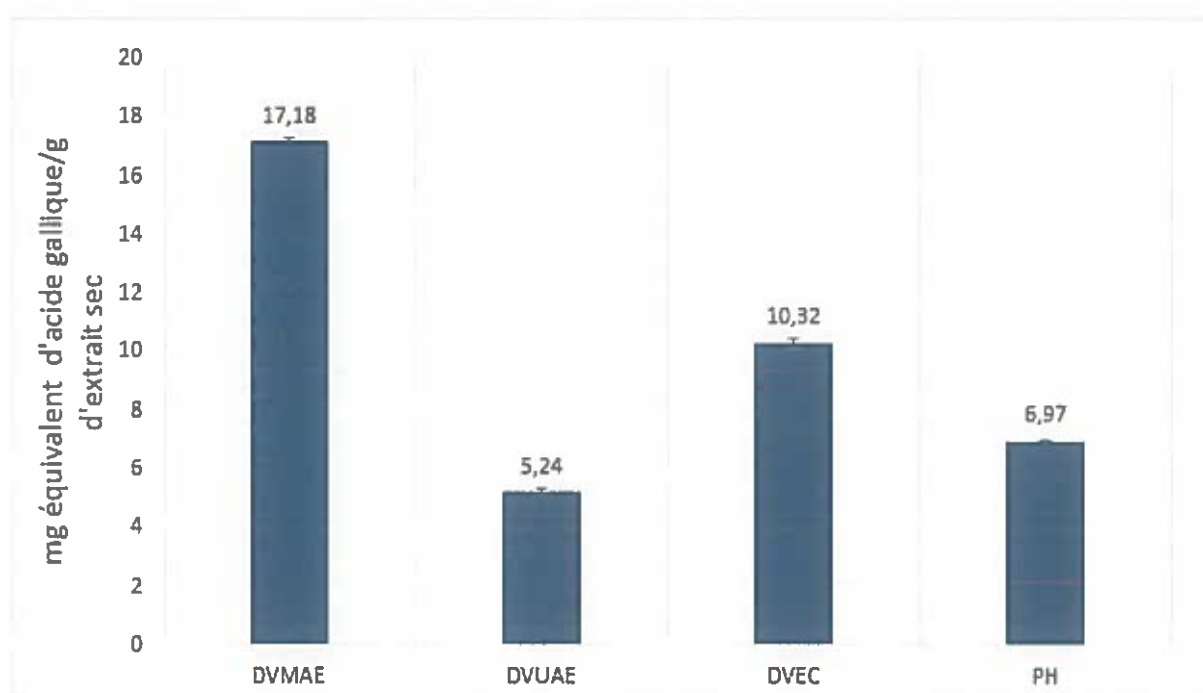


Figure 13: Teneur des extraits en polyphénols totaux.

Le taux de polyphénols totaux dans l'extrait aqueux des graines du *P. halepensis* Mill. est de 6,97 mg/g. Alors que dans les trois extraits éthanoliques de *D. viscosa*, les taux varient de 5,24 à 17,18 mg/g. Le taux de polyphénol le plus élevé a été détecté pour l'extrait de *D. viscosa* obtenue par microonde (17,18 mg/g) suivie de l'extrait obtenue par l'extraction conventionnelle (10,32 mg/g) et en dernier celui de l'extraction par ultrasons (5,24 mg/g).

En se référant aux résultats obtenus par (Kadri, 2014) concernant les graines de *P. halepensis* Mill. dont le taux en polyphénols est de 3,71 mg/g. On en déduit que l'extrait de nos graines est plus riche en polyphénols à savoir une teneur en double pour les polyphénols, 6.97mg/g.

D'après les investigations antérieures, le taux moyen des polyphénols dans les extraits issus de *D. viscosa* variait généralement entre 103 et 441 mg EAG/g sec selon le solvant utilisé (Chahmi et al., 2015, Side Larbi, 2016). La fraction méthanolique a été trouvée contenant des taux de 8,48 mg GAE/g d'extrait (Trimech et al., 2014), 274,39 mg GAE/g d'extrait (Chahmi et al., 2015), 176.9 mg GAE/g d'extrait (Gökbulut et al., 2013) et 0,85 µg/ml (El Ouariachi and Bouyanzer, 2015).

En vue de ces résultats nous pouvons conclure qu'en réalité une estimation du taux de polyphénols via le réactif de Folin-Ciocalteu présente une faible spécificité dont l'inconvénient principal est le dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement ceux des composés phénoliques, mais également de certains sucres et protéines, donnant ainsi un taux phénolique apparent élevé (Gómez-Caravaca et al., 2008). Cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage (Athamena et al., 2010). Il est important aussi de savoir que le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Des études ont montrés que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques l'irrigation,), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage) ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Athamena et al., 2010, Bouzid et al., 2011). Ceci peut donc expliquer la faible teneur de nos extraits en composés poly phénoliques par rapport aux extraits déjà mentionnés au-dessus.

IV.2.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été calculée en mg équivalent catéchine /g de matière végétale sèche (mg E C/ g matière végétale sèche) en se référant à la courbe d'étalonnage de la catéchine (figure 2 annexes).

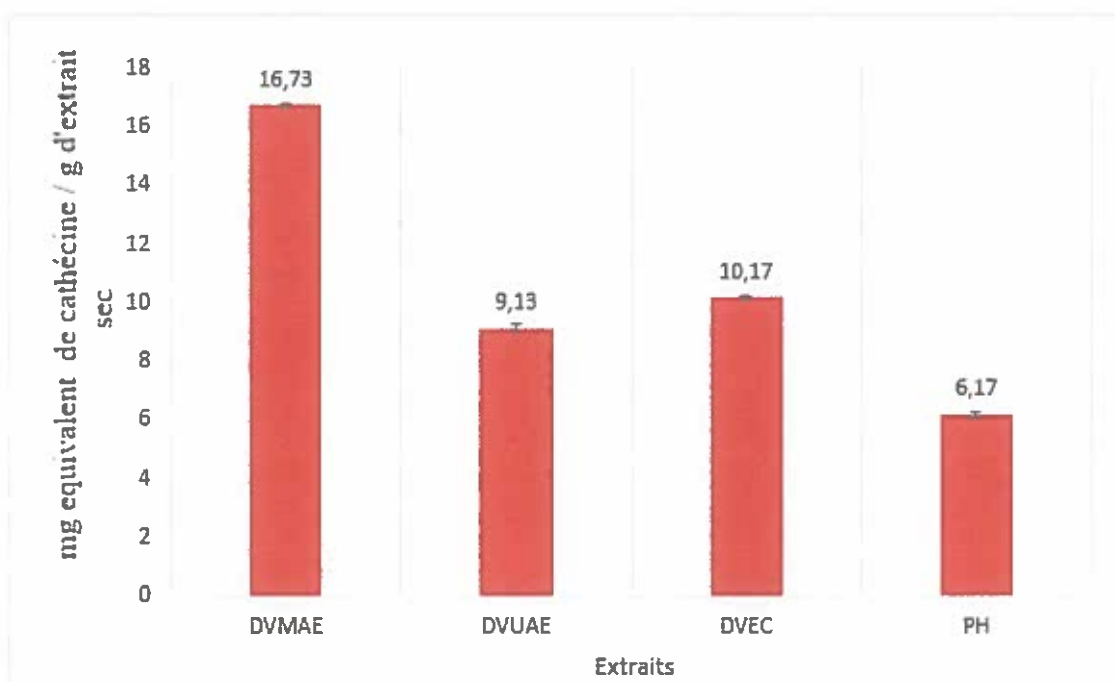


Figure 14 : Teneur des extraits en flavonoïdes.

Le taux de flavonoïdes dans l'extrait aqueux des graines du *P. halepensis* Mill. est de 6,17 mg/g. Alors que dans les trois extraits éthanoliques de *D. viscosa* varient de 9,13 à 16,73 mg/g. Le taux le plus élevé dans l'extrait est obtenu par microonde (16,73 mg/g) suivie de l'extrait obtenue par extraction conventionnelle (10,17 mg/g) et enfin celui obtenue par ultrason (9,13 mg/g).

D'après les résultats obtenus par (Kadri, 2014) concernant *P. halepensis* Mill. dont le taux en flavonoïdes est de 0,80 mg/g. On en déduit que l'extrait de nos graines est plus riche en flavonoïdes avec 6,17 mg/g. Les résultats obtenus pour *D. viscosa* sont différents par rapport à ceux trouvés par (Chahmi et al., 2015). Cependant, (El Ouariachi and Bouyanzer, 2015) ont estimé des valeurs des teneurs plus élevées que les nôtres de 32 et de 74 mg EC/g sec, en utilisant le di éthyle /éther et l'éthyle/acétate comme solvants d'extraction.

Par comparaison aux travaux antérieurs, les teneurs en flavonoïdes sont fortement affectées par les solvants d'extraction (caractérise les extraits polaires) et par le stress climatique tel que les températures élevées, l'exposition au soleil, la sécheresse et la salinité (Rai and Carpinella, 2006). En effet, l'augmentation du métabolisme des composés phénoliques y compris les flavonoïdes peut être liée aux différentes conditions et ces

différences de teneur peuvent être expliquées par l'âge durant lequel la synthèse des métabolites secondaires diminue (Kadri, 2014).

IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante

IV.3.1. L'inhibition du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Dans cette étude, l'extrait aqueux de *P. halepensis* Mill. et les extraits éthanoliques de *D. viscosa* ont été étudiés pour leur activité antioxydante en utilisant le DPPH. Le pourcentage d'inhibition de radical DPPH par les extraits testés en fonction de concentration sont montrés sur la figure 15. La comparaison et la validation des résultats ont été effectuées avec un contrôle positif utilisant le BHT (figure 3 annexes).

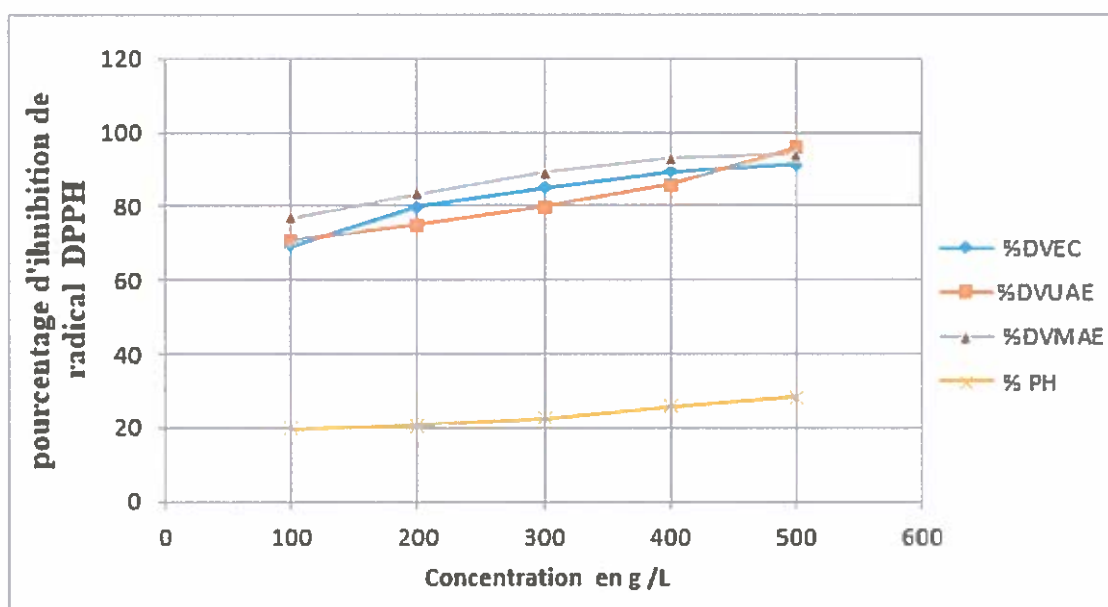


Figure 15: Pourcentage d'inhibition de radical DPPH.

Une courbe d'allure exponentielle est obtenue, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical de DPPH et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel. Cela indique que nos extraits contiennent des composés à pouvoir antioxydant.

Le pourcentage d'inhibition du radical de DPPH par les extraits éthanoliques de *D. viscosa* est de l'ordre de 69,1 à 91,21 % pour DVEC, 70,68 à 95,76 % pour DVUAE et de 76,93 à 93,96 % pour DVMAE à des concentrations allant de 0,1 à 0,5 g/L. Alors que pour *P. halepensis* Mill. le pourcentage de piégeage de DPPH varie de 19,73 à 28,15 %.

Les profils d'activité scavenger du radical DPPH obtenue révèlent que l'extrait éthanolique de DVUAE est le plus actif parmi les extraits testés avec un pourcentage

d'inhibition maximal supérieur à 95 % à une concentration de 0,5g/ml suivie de DVMAE (93%) puis de DVEC (91%). Or que, pour l'extrait aqueux de *P. halepensis* Mill. le pourcentage scavenger est considéré faible (28 %).

Des contributions antérieures ont rapportées l'activité antioxydante de *D. viscosa* au Maroc où les extraits ont exhibés un pourcentage d'inhibition de 87 %. Il pourrait impliquer une corrélation positive entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante, à l'exemple de l'extrait d'acétate éthylique ou il a été trouvé que l'activité plus élevée a pu être attribuée à la forte teneur des composés phénoliques et des flavonoïdes. Par exemple l'extrait d'acétate éthylique, qui contiennent un taux plus élevé de composés phénoliques (441 µg/mg) également exhibé une plus grande activité antioxydante. Ces résultats peuvent être dus aux groupes d'hydroxyle existant dans la structure chimique des composés phénoliques qui peuvent fournir le composant nécessaire comme extracteur radicalaire. En général, les interactions synergiques entre les différents constituants d'un extrait de composés phénoliques sont à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important (El Ouariachi et al., 2014, Gökbulut et al., 2013).

Il a été suggéré que la formation des O-quinones et de leurs redox faisant un cycle dans les composés phénoliques, peut exercer une contribution principale à un effet d'antioxydant ou de pro-oxydant. Le catéchol et les O-quinones, ces deux flavonoïdes ont des groupements hydroxyles libres à C-3 'et à C-4 '. Dans le cas de l'extrait de racine d'acétate éthylique, qui a montré la plus haute activité antioxydante dans l'analyse de DPPH, la présence de l'acide quinique de dicaffeoyl, le 7-methylether d'aromadendrin, ont probablement un effet synergique dû au dispositifs structuraux de ces composés, par exemple, aucun groupe 3'-OH et/ou acétylation du groupe 3-OH. L'absence de 3'-OH et/ou l'acétylation de 3-OH pourrait être la raison pour laquelle l'extrait éthylique a montré la plus forte activité antioxydante (Trimech et al., 2014). Les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH , en raison de leur chimie structurale idéale (Athamena et al., 2010). Les huiles essentielles de *P. halepensis* Mill. étudiées pouvaient en mesure à réduire le radical stable par un effet donateur d'hydrogène avec des IC 50 inférieure au BHA et BHT, des valeurs qui s'étendent de $212,96 \pm 2,19$ à $284,12 \pm 3,99$ g/ml (Djerrad et al., 2015).

IV.3.2. Pouvoir réducteur : FRAP

Le test de pouvoir réducteur est une méthode simple et pratique pour déterminer l'activité des antioxydants. Les ions ferreux à partir de réactif (ferricyanure de potassium) de FRAP sont réduits par les antioxydants testés et forment un complexe bleu intense (Fe²⁺). Les résultats obtenus par la quercétine sont représentés dans la (figure 4 annexes).

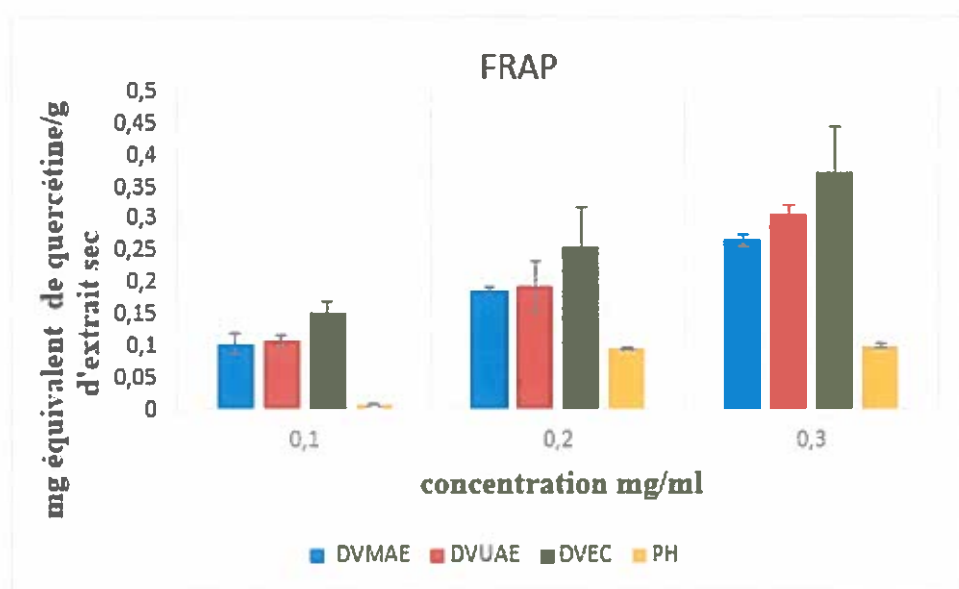


Figure 16: Histogramme montrant le pouvoir réducteur.

Le pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique des extraits a été évalué à une concentration de 0,1 à 0,3 mg/ml et les résultats ont été exprimés en mg EQ de quercétine /g d'extrait, à partir des données des absorbances et de la courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine (figure 4 annexes) à des concentrations allant de 0,1 à 0,5 mg/ml. Dans ce test, la présence des espèces réducteurs dans les extraits provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanure à la forme ferreuse. Par conséquent, le Fe²⁺ peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Remila, 2015).

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait de *P. halepensis* Mill. a exhibé une activité réductrice variant entre $0,009 \pm 0,0001$ mg EQ/g E et $0,101 \pm 0,003$ mg EQ /g E.

Par ailleurs, une importante activité réductrice a été signalée pour les extraits de feuilles de *D. viscosa* exprimant ainsi des valeurs avoisinant de $0,104 \pm 0,007$ mg EQ/g E à $265 \pm 0,038$ pour l'extrait obtenu par microonde. Ainsi l'extrait par ultrasons s'est avéré qu'il est plus actif par des valeurs allant de $0,109 \pm 0,015$ mg EQ/g E à $0,306 \pm 0,009$ mg EQ /g E.

Quant à l'extrait par extraction conventionnelle, il est considéré comme étant le plus actifs des quatre fractions testées avec des fonctions inhibitrices allant de $0,154 \pm 0,015$ mg EQ /g E jusqu'à $0,374 \pm 0,07$ mg EQ/g E.

Le puissant effet réducteur est localisé au niveau des fractions de *D. viscosa* obtenu par extraction conventionnelle, suivie de *D. viscosa* par ultrasons et la plus faible est attribuée à l'extrait obtenu par microonde. En revanche le pouvoir le plus faible est attribué à *P. halepensis* Mill.

Ce pouvoir donateur d'électrons est dose dépendante, en effet il augmente proportionnellement avec la concentration (Djerrad et al., 2015) a montré un pouvoir réducteur modéré des huiles essentielles de *P. halepensis* Mill. En effet, les tests montrent que les extraits possèdent une bonne affinité avec les ions Fe.

Cette capacité de réduction des radicaux libres par les extraits éthanoliques de *D. viscosa* ainsi l'extrait aqueux *P. halepensis* Mill. est due, principalement, à leur profil chimique riche en composés phénoliques tels que le l'estragol. Ces composés, grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et d'oxygène singulier afin de neutraliser les ERO.

Cette différence entre les extraits au sein de la même plante ou même entre les deux plantes employées, peut être interprétée par la présence de molécules à caractère polaire tels que les composés phénoliques hydroxylés ou les molécules glycosylées ainsi que la teneur en ces composés (Siddhuraju and Becker, 2007, Soobrattee et al., 2005) .Ce qui est en corrélation avec la teneur de nos extraits en composés phénoliques. Généralement, les propriétés réductrices sont associées à la présence des composés qui exercent leur action par la rupture de la chaîne de radicaux libres par intermédiaire de donner un atome d'hydrogène les convertit en produits plus stables(Chahmi et al., 2015).

IV.3.3. Evaluation de la capacité de piégeage de radical hydroxyle

La figure montre le pourcentage de piégeage de radical hydroxyle par l'extrait aqueux de *P. halepensis* Mill. et les extraits éthanoliques de *D. viscosa* à une concentration de 0,1g/L, de même l'acide ascorbique qui est utilisé comme référence. Les résultats sont montrés dans la figure 17.

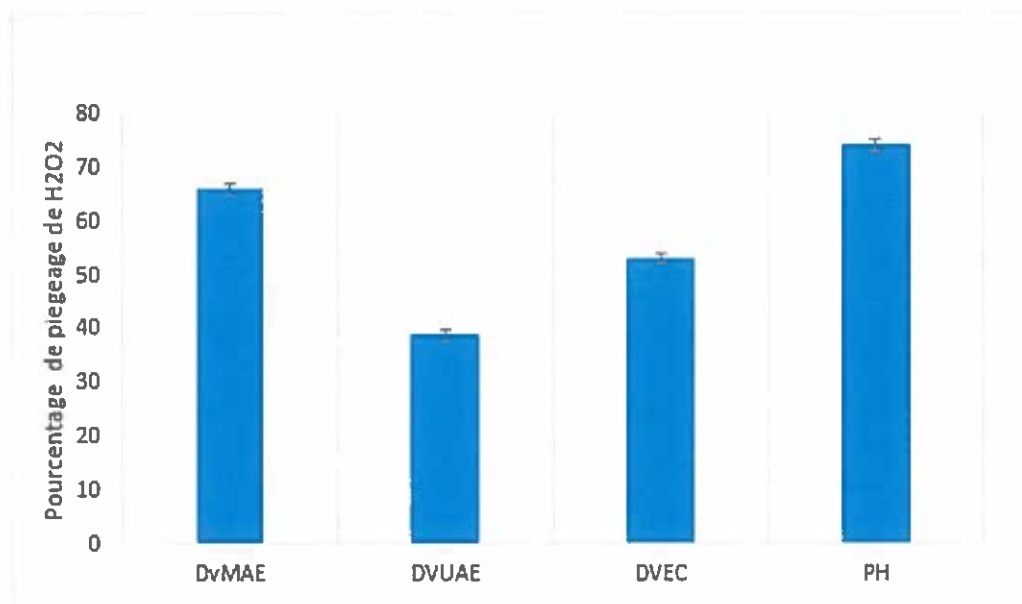


Figure 17: Pourcentage de piégeage de radical hydroxyle .

Dans les quatre fractions testées nous avons signalés des pourcentages de piégeage de radical hydroxyle de 74,31 % pour PH suivie de DVMAE avec 66,05 %, DVEC avec 53,21 % et DVUAE avec 38,82 %. Cette différence obtenue peut être probablement expliquée par la grande teneur de nos extraits en espèces attracteurs de radical d'hydroxyle. Ces résultats ont mené à conclure que les extraits de *P. halepensis* Mill. et *D. viscosa* exercent une capacité anti radical OH significative. Cela peut être expliqué par la présence de nombreux groupes hydroxyles libres et des composés phénoliques résiduels.

Parmi l'espèce réactive de l'oxygène, le radical d'hydroxyle est connu en tant que plus réactif avec presque toutes les macromolécules biologiques. Le radical hydroxyle cause des dommages cellulaires. Le mécanisme le plus important pour la formation de radicaux d'hydroxyle *in vivo* est la réaction du Fenton. Dans laquelle une transition du métal est impliquée en tant que pro oxydant aboutissant à la décomposition de l'anion superoxide et de peroxyde d'hydrogène.

Les composés phénoliques pourraient délocaliser la charge en stabilisant les radicaux. D'ailleurs, deux genres de mécanisme antioxydant sont actuellement proposés. Le premier sert à nettoyer le radical d'hydroxyle produit tandis que le deuxième sert à supprimer la génération de radical d'hydroxyle (Nadour et al., 2015) .

IV.4. Activité anti hémolytique

L'activité anti hémolytique des extraits a été mesurée par rapport à la peroxydation des érythrocytes induite par le peroxyde d'hydrogène. Des DO ont été prises après incubation et les pourcentages d'inhibition sont présentés dans la figure 18.

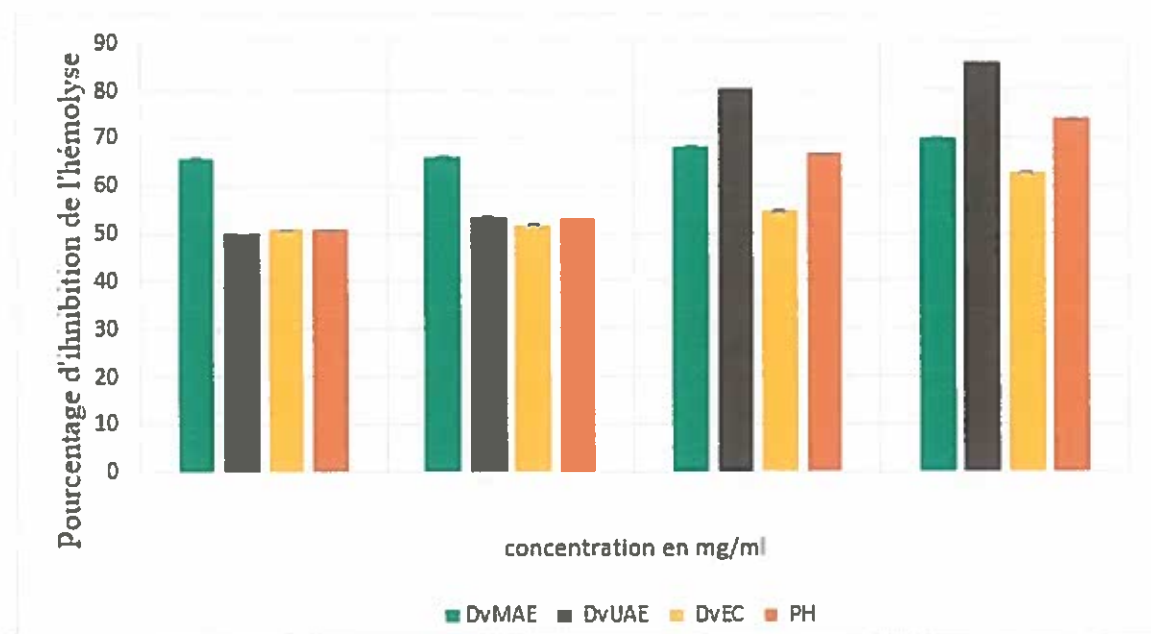


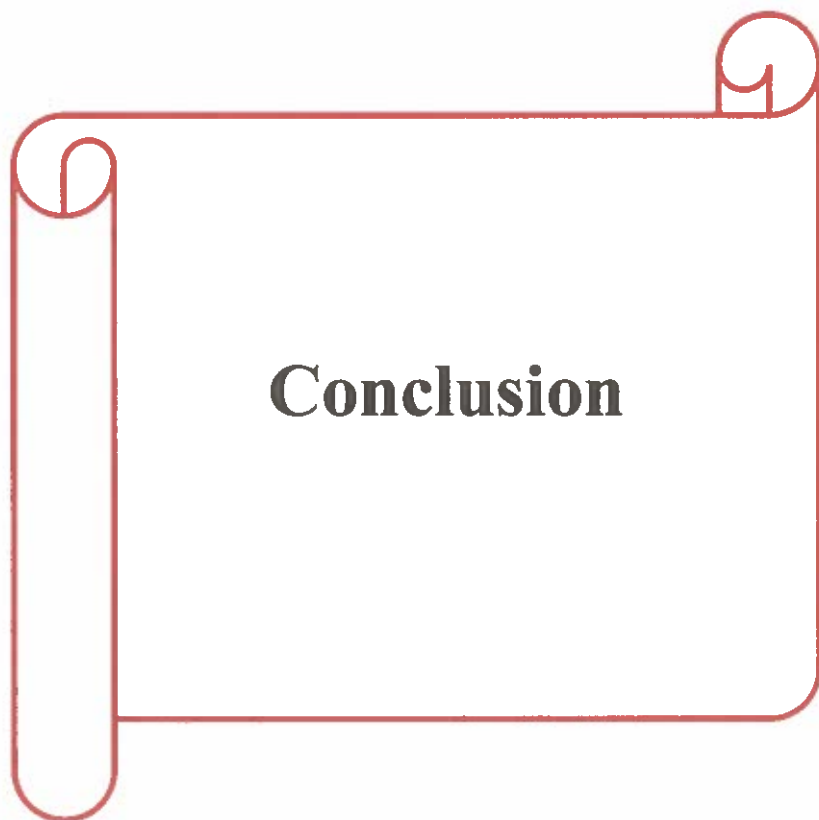
Figure 18: Pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des quatre extraits varie avec la concentration dans une gamme de 49,91 à 85,51 %.

Pour une concentration de 0,25 et 0,5 mg/ml, le pourcentage d'inhibition le plus élevé est enregistré pour DVMAE avec 65,57 et 66 % respectivement, suivi par DVUAE, DVEC et *P. halepensis* Mill. avec des pourcentages d'inhibition qui se rapprochent. En revanche, pour une concentration de 0,75, un pourcentage d'inhibition de 80,2 % est donné par DVUAE suivie par DVMAE (68 %), PH (66,68 %) en en fin DVEC (54,68 %). A 1 mg/ml, nous avons signalés un pourcentage d'inhibition de 85,51 % donné par DVUAE suivie par PH (73,83 %) puis l'extrait DVMAE (69,83%) et enfin DVEC (62,78%). Les extraits ont montré une activité anti hémolytique élevée par rapport au témoin utilisé (l'acide ascorbique) qui a présenté des pourcentages d'inhibition qui varient dans une gamme de 25,90 % à 36,31% (figure 5 annexes). Dans cette étude, l'inhibition de l'hémolyse s'est avérée qu'elle augmente avec l'augmentation de la concentration d'extrait quand des globules rouges ont été traités avec H₂O₂.

Les globules rouges sont les cibles primaires des radicaux libres, dû à la richesse en acides gras polyinsaturés (acides linoléiques, l'acide arachidoniques en particulier). D'ailleurs, les globules rouges sont en particulier exposé aux dommages oxydants endogènes en raison de leur rôle spécifique comme porteurs de l'oxygène (Paiva-Martins et al., 2009) et au transport de O₂ qui lié à l'hémoglobine (Dai et al., 2006). La désorganisation des membranes érythrocytaires, la libération de l'hémoglobine provoquent la génération de fer. Ces derniers sont les instigateurs efficaces du ERO. L'oxydation épuise la teneur en protéines, déforme les érythrocytes et déränge la microcirculation (Yasmeen and Hassnain, 2016). Quand l'hémoglobine est dénaturée, à la membrane au domaine cytoplasmique de la bande 3 protéine, induisant son agrégation et la tringlerie de la fixation d'anticorps et de complément de l'anti-bande 3 sur la surface d'érythrocyte, marquant la cellule pour être phagocyté par les macrophages du système réticulo-endothélial. sont, donc, un système modèle métaboliquement simplifié, utile dans l'évaluation des propriétés antioxydantes de plusieurs composés (Paiva-Martins et al., 2009).

Ceci peut se produire en raison de la nature d'oxydation avec la dégradation de membrane de cellules et au dégagement d'hémoglobine par son oxydation en méthémoglobine (Paiva-Martins et al., 2009). Le H₂O₂ causent également la mobilisation de Fe²⁺ par Ca²⁺ par l'intermédiaire de réduction de Fenton aboutissant à la production des intermédiaires radicalaires OH[•] (Paiva-Martins et al., 2009). Tous ces facteurs combinés causent la déstabilisation de la membrane de cellules, qui probablement régit l'événement de la lyse cellulaire. Les polyphénols possèdent beaucoup d'effets biologiques, principalement attribués à leur effets scavenger antioxydants, particulièrement l'inhibition de la peroxydation et chélation des métaux de transition par des flavonoïdes et des glycosides (Ebrahimzadeh et al., 2010, Nadour et al., 2015) ont supposés que la capacité de protéger les globules rouges contre l'hémolyse est relié non seulement à une activité radicalaire mais également à sa capacité d'agir directement à la surface externe ou interne de la membrane, induisant des modifications du profil de protéine.



Conclusion

Cette étude à travers l'analyse phytochimique, nous a permis de mettre en évidence des composés phénoliques et des flavonoïdes, dans les extraits de graines de *Pinus halepensis* Mill. et les feuilles de *Dittrichia viscosa*. L'étude des effets biologiques *in vitro* quant à elle, a montré un puissant effet anti radicalaire des extraits éthanoliques de *D. viscosa* dans l'inhibition du radical DPPH, dont l'extrait obtenue par ultrason, apparait le plus actif avec une inhibition maximale supérieure à 95 %. Pour la méthode de FRAP, le puissant effet réducteur est localisé au niveau des fractions de *D. viscosa* obtenu par extraction conventionnelle avec $0,374 \pm 0,07$ mg EQ/g E. Par ailleurs, l'extrait de *P. halepensis* Mill. a exhibé un fort potentiel de piégeage de radical hydroxyle avec un pourcentage de 74,31 %. Or, que pour l'activité anti hémolytique l'extrait de *D. viscosa* obtenue par ultrason montre un potentiel d'inhibition significativement élevée, supérieure à 80 %.

En effet, il est extrêmement important de préciser qu'il y a une corrélation positive entre le potentiel d'activité antioxydante et anti hémolytique et la diversité quantitative et/ou qualitative des composés phénoliques présents dans les extraits. Cela pourrait aussi s'expliquer par la sensibilité propre à chaque test.

Ce travail préliminaire permet de répondre partiellement quant à l'utilisation de ces deux plantes dans la médecine traditionnelle. Il pourrait être intéressant d'employer ces extraits en tant qu'additifs alimentaires pour protéger les produits de la dégradation radicalaire. Par ailleurs, et plus loin peuvent être utiliser dans la prévention et le traitement des pathologies impliquant une production excessive de radicaux libres tels que la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et l'hémolyse.

Cependant, la mise au point de phytomédicaments à base de ces extraits, nécessite des études complémentaires en vue d'isoler et identifier les composés responsables des effets pharmacologiques. Mais au terme de ces informations, s'impose une suite expérimentale indispensable basée sur les axes suivants :

- L'identification est nécessaire pour obtenir un profil plus complet de la composition phénolique des deux plantes.
- L'isolement des familles moléculaires de chaque plante ainsi leur intérêt thérapeutique.
- Déterminer la toxicité *in vivo* et en précisant la DL50.



**Références
Bibliographiques**

Références bibliographiques

- ABAD, M., GUERRA, J., BERMEJO, P., IRURZUN, A. & CARRASCO, L. 2000. Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Phytotherapy research*, 14, 604-607.
- ABUHAMDAH, S., ABUHAMDAH, R., AL-OLIMAT, S. & CHAZOT, P. 2013. Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Jordan.
- AFONSO, V., CHAMPY, R., MITROVIC, D., COLLIN, P. & LOMRI, A. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74, 324-329.
- AISSAT, S. 2015. Propriétés anti-oxydantes de quelques variétés de miels Algériens.
- AL-DISSI, N. M., SALHAB, A. S. & AL-HAJJ, H. A. 2001. Effects of Inula viscosa leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 77, 117-121.
- ARDAILLOU, R. 2004. Stress oxydatif et prédiction des accidents cardiovasculaires. *médecine/sciences*, 20, 264-264.
- AŞKIN ÇELİK, T. & ASLANTÜRK, Ö. S. 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of Inula viscosa leaf extracts with Allium test. *Journal of BioMed Research*, 2010.
- ATHAMENA, S., CHALGHEM, I., KASSAH-LAOUAR, A., LAROUI, S. & KHEBRI, S. 2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum cyminum L. *Lebanese Science Journal*, 11, 69-81.
- BACOT, S. 2004. *Caractérisation d'un nouvel aldéhyde d'origine plaquettaire (4-hydroxydodecadienal) et formation d'adduits de Michael avec les phospholipides à éthanolamine*. Lyon, INSA.
- BAKŠIĆ, N., BAKŠIĆ, D. & JAZBEC, A. 2017. Hourly fine fuel moisture model for Pinus halepensis (Mill.) litter. *Agricultural and Forest Meteorology*, 243, 93-99.
- BARROS, L., FERREIRA, M.-J., QUEIROS, B., FERREIRA, I. C. & BAPTISTA, P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 103, 413-419.
- BARTOSZ, G. 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.
- BERGER, M. M. 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 48-53.

- BOUGANDOURA, N. & BENDIMERAD, N. 2013. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, 14.
- BOUTABIA, L., TELAILIA, S. & DE BELAIR, G. 2015. Corticolous lichen flora on *Quercus suber* L. in the wetlands of El Kala national park (North-Eastern Algeria). *Advances in Environmental Biology*, 360-373.
- BOUZID, W., YAHIA, M., ABDEDDAIM, M., ABERKANE, M. & AYACHI, A. 2011. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'Aubepine *Monogyne*. *Lebanese Science Journal*, 12, 59-69.
- CHAHMI, N., ANISSI, J., JENNAN, S., FARAH, A., SENDIDE, K. & EL HASSOUNI, M. 2015. Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5, 228-233.
- CHEBOUTI ET MEZIOU, N. Contributions to Study of the Antimicrobial Activity of *Inula Viscosa* Harvested in Boumerdes (Algeria).
- CHEIKH-ROUHO, S., HENTATI, B., BESBES, S., BLECKER, C., DEROANNE, C. & ATTIA, H. 2006. Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 12, 407-415.
- DAHMOUNE, F. 2013. *Extraction des polyphénols par Micro-ondes et Ultrasons. Etude de cas: Fractionnement des polyphénols par la technique CGA* Doctorat, ABDERRAHMANE MIRA DE BEJAIA.
- DAHMOUNE, F., REMINI, H., DAIRI, S., AOUN, O., MOUSSI, K., BOUAOUDIA-MADI, N., ADJEROUD, N., KADRI, N., LEFSIH, K. & BOUGHANI, L. 2015. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *P. lentiscus* L. leaves: Comparative study of artificial neural network (ANN) versus degree of experiment for prediction ability of phenolic compounds recovery. *Industrial Crops and Products*, 77, 251-261.
- DAI, F., MIAO, Q., ZHOU, B., YANG, L. & LIU, Z.-L. 2006. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sciences*, 78, 2488-2493.
- DANINO, O., GOTTLIEB, H. E., GROSSMAN, S. & BERGMAN, M. 2009. Antioxidant activity of 1, 3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Research International*, 42, 1273-1280.

- DJERRAD, Z., KADIK, L. & DJOUAHRI, A. 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products*, 74, 440-449.
- EBRAHIMZADEH, M., NABAVI, S., NABAVI, S. & ESLAMI, B. 2010. Antioxidant and antihemolytic activities of *Mentha piperita*. *Pharmacologyonline*, 1, 744-752.
- EDMOND, R. 2003. Stress oxydant, micronutriments et santé. *Université d'été de Nutrition*, 35-38.
- EL OUARIACHI, E. & BOUYANZER, A. 2015. Antioxidant activity of solvent extracts of *Inula viscosa* from Morocco. *Arabian Journal of Chemical and Environmental Research*, 1, 33-40.
- EL OUARIACHI, E., LAHHIT, N., BOUYANZER, A., HAMMOUTI, B., PAOLINI, J., MAJIDI, L., DESJOBERT, J. & COSTA, J. 2014. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Morocco. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6, 743-748.
- FAVIER, A. 2003. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- FEKIH, N., ALLALI, H., MERGHACHE, S., CHAÏB, F., MERGHACHE, D., EL AMINE, M., DJABOU, N., MUSELLI, A., TABTI, B. & COSTA, J. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 97-103.
- FEKIKH, N. 2015. *PROPRIETES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES DE TROIS ESPECES DU GENRE PINUS POUSSANT EN ALGERIE*. Mascara.
- FENDRI, C., MECHRI, A., KHIARI, G., OTHMAN, A., KERKENI, A. & GAHA, L. 2006. Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la schizophrénie: revue de la littérature. *L'Encéphale*, 32, 244-252.
- FERNANDEZ, C., MONNIER, Y., ORMEÑO, E., BALDY, V., GREFF, S., PASQUALINI, V., MÉVY, J.-P. & BOUSQUET-MÉLOU, A. 2009. Variations in allelochemical composition of leachates of different organs and maturity stages of *Pinus halepensis*. *Journal of chemical ecology*, 35, 970-979.
- FERNANDEZ, C., SANTONJA, M., GROS, R., MONNIER, Y., CHOMEL, M., BALDY, V. & BOUSQUET-MÉLOU, A. 2013. Allelochemicals of *Pinus halepensis* as drivers of biodiversity in Mediterranean open mosaic habitats during the colonization stage of secondary succession. *Journal of chemical ecology*, 39, 298-311.

- FERREIRA, R. A., OLIVEIRA, A. B., RIBEIRO, M. F., TAFURI, W. L. & VITOR, R. W. 2006. Toxoplasma gondii: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1, 4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Experimental parasitology*, 113, 125-129.
- FONTAINE, E., BARNOUD, D., SCHWEBEL, C. & LEVERVE, X. 2002. Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11, 411-420.
- GARDÈS-ALBERT, M., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., ABEDINZADEH, Z. & JORE, D. 2003. Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- GHANMI, M., SATRANI, B., CHAOUCH, A., AAFI, A., ABID, A. E., ISMAILI, M. R. & FARAH, A. 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (Pinus pinaster) et du pin d'Alep (Pinus hale-pensis) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 154, 293-300.
- GÖKBULUT, A., ÖZHAN, O., SATILMIŞ, B., BATÇIOĞLU, K., GÜNAL, S. & ŞARER, E. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities and phenolic compounds of selected Inula species from Turkey.
- GÓMEZ-CARAVACA, A. M., CERRETANI, L., BENDINI, A., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., DEL CARLO, M., COMPAGNONE, D. & CICHELLI, A. 2008. Effects of fly attack (Bactrocera oleae) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 4577-4583.
- GONZÁLEZ-TEJERO, M., CASARES-PORCEL, M., SÁNCHEZ-ROJAS, C., RAMIRO-GUTIÉRREZ, J., MOLERO-MESA, J., PIERONI, A., GIUSTI, M., CENSORII, E., DE PASQUALE, C. & DELLA, A. 2008. Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 341-357.
- GUEDIRA, A., LAMHAMED, M. S., SATRANI, B., BOULMANE, M., SERRAR, M. & DOUIRA, A. 2012. Valorisation des matières résiduelles et de la biomasse forestière au Maroc: Compostage et confection de substrats organiques pour la production de plants forestiers. *Nature & Technology*, 87.
- HALENG, J., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.-O., CHARLIER, C. & CHAPPELLE, J.-P. 2007. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liege*, 62, 628-38.
- HALLIWELL, B. 2006. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in biochemical sciences*, 31, 509-515.

- HAMROUNI, L., HANANA, M., GHAZI, G., AINI, R. & KHOUJA, M. L. 2011. Essais de multiplication du Pin d'Alep. *Forêt méditerranéenne*, 32, 271-276.
- HAOUI, I. E., DERRICHE, R., MADANI, L. & OUKALI, Z. 2015. Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 587-590.
- HERNÁNDEZ, V., DEL CARMEN RECIO, M., MÁÑEZ, S., PRIETO, J. M., GINER, R. M. & RÍOS, J. L. 2001. A mechanistic approach to the in vivo anti-inflammatory activity of sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula viscosa*. *Planta Medica*, 67, 726-731.
- HERNÁNDEZ, V., RECIO, M. C., MÁÑEZ, S., GINER, R. M. & RÍOS, J.-L. 2007. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life sciences*, 81, 480-488.
- HUBERT, J. 2006. *Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja: étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines*. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- JANAKIRAMAN, M. & JEYAPRAKASH, K. 2015. Screening of phytochemical and in vitro antioxidant efficacy of *Vitex negundo* L. leaf extract. *International Journal of Emerging Trends in Science and Technology*, 2, 1-7.
- JUN, X., DEJI, S., YE, L. & RUI, Z. 2011. Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive components of green tea extracts by different extraction methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 408, 97-101.
- KADRI, N. 2014. *GRAINES DE PINUS SP.: CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE*. Doctorat BEJAIA
- KADRI, N., KHETTAL, B., ADJEBLI, A., CRESTEIL, T., YAHIAOUI-ZAIDI, R., BARRAGAN-MONTERO, V. & MONTERO, J.-L. 2014. Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial Crops and Products*, 54, 6-12.
- KADRI, N., KHETTAL, B., AID, Y., KHERFELLAH, S., SOBHI, W. & BARRAGAN-MONTERO, V. 2015. Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food chemistry*, 188, 184-192.
- KADRI, N., KHETTAL, B., YAHIAOUI-ZAIDI, R., BARRAGAN-MONTERO, V. & MONTERO, J.-L. 2013. Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria. *Industrial Crops and Products*, 51, 116-122.

- KHABBACH, A., LIBIAD, M., ENNABILI, A. & BOUSTA, D. 2012. Medicinal and cosmetic use of plants from the province of Taza, Northern Morocco. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11, 46-60.
- KOECHLIN-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.
- LAGHRIFI, K., EL IDRISSE, M., MAKOUDE, Y. & ALNAMER, R. 2013. In Vitro Antibacterial Activity Of The Methanolic And Ethanolic Extract Of Inula Viscosa Used In Moroccan Traditional Medicine. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 2, 3963-3976.
- LAGUERRE, M., LÓPEZ-GIRALDO, L. J., LECOMTE, J., PINA, M. & VILLENEUVE, P. 2007. Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 14, 278-292.
- LEE, S. E., HWANG, H. J., HA, J.-S., JEONG, H.-S. & KIM, J. H. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life sciences*, 73, 167-179.
- MAESTRE, F. T. & CORTINA, J. 2004. Are Pinus halepensis plantations useful as a restoration tool in semiarid Mediterranean areas? *Forest Ecology and Management*, 198, 303-317.
- MAESTRE, F. T., CORTINA, J., BAUTISTA, S. & BELLOT, J. 2003. Does Pinus halepensis facilitate the establishment of shrubs in Mediterranean semi-arid afforestations? *Forest Ecology and Management*, 176, 147-160.
- MAMOCI, E., CAVOSKI, I., SIMEONE, V., MONDELLI, D., AL-BITAR, L. & CABONI, P. 2011. Chemical composition and in vitro activity of plant extracts from Ferula communis and Dittrichia viscosa against postharvest fungi. *Molecules*, 16, 2609-2625.
- MÁÑEZ, S., HERNÁNDEZ, V., GINER, R.-M., RÍOS, J.-L. & DEL CARMEN RECIO, M. 2007. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from Inula viscosa. *Fitoterapia*, 78, 329-331.
- MELO-SILVEIRA, R. F., FIDELIS, G. P., COSTA, M. S. S. P., TELLES, C. B. S., DANTAS-SANTOS, N., ELIAS, S. D. O., RIBEIRO, V. B., BARTH, A. L., MACEDO, A. J. & LEITE, E. L. 2011. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. *International journal of molecular sciences*, 13, 409-426.
- MIGDAL, C. & SERRES, M. 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27, 405-412.

- NABAVI, S. F., NABAVI, S. M., SETZER, W. N., NABAVI, S. A., NABAVI, S. A. & EBRAHIMZADEH, M. A. 2013. Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits. *Fruits*, 68, 185-193.
- NADOUR, M. 2015. *Extraction ,caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issus des sous produits .valorisation des polysaccharides à visée alimentaire.* doctorat, Mouloud Mammeri de Tizi -Ouzou
- NADOUR, M., LAROCHE, C., PIERRE, G., DELATTRE, C., MOULTI-MATI, F. & MICHAUD, P. 2015. Structural characterization and biological activities of polysaccharides from olive mill wastewater. *Applied biochemistry and biotechnology*, 177, 431-445.
- NAGMOTI, D. M., KHATRI, D. K., JUVEKAR, P. R. & JUVEKAR, A. R. 2012. Antioxidant activity free radical-scavenging potential of Pithecellobium dulce Benth seed extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 2, 37-43.
- OUELLET, C., BILODEAU, G. & CANTIN, A. M. 2007. Stress oxydatif, tabagisme et CFTR- Est-ce que le tabagisme peut conduire à la mucoviscidose? *médecine/sciences*, 23, 9-10.
- PAIVA-MARTINS, F., FERNANDES, J., ROCHA, S., NASCIMENTO, H., VITORINO, R., AMADO, F., BORGES, F., BELO, L. & SANTOS-SILVA, A. 2009. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Molecular nutrition & food research*, 53, 609-616.
- PINCEMAIL, J., BONJEAN, K., CAYEUX, K. & DEFRAIGNE, J.-O. 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 233-239.
- RAI, M. & CARPINELLA, M. C. 2006. *Naturally occurring bioactive compounds*, Elsevier.
- RATHGEBER, C. 2002. Impact des changements climatiques et de l'augmentation du taux de CO2 atmosphérique sur la productivité des écosystèmes forestiers: exemple du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Provence calcaire (France). *Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléocéologie. Marseille, Université d'Aix-Marseille III*, 276.
- REMILA, S. 2015. *Evaluation des activités biologiques in vitro et in vivo des extraits de Pistacia lentiscus.* . Bejaia.
- RIOUX, C. 2009. STRESS OXYDATIF ET PRÉVENTION DES MALADIES CHRONIQUES. *La supplémentation s" impose t-elle.*

- SEIFRIED, H. E., ANDERSON, D. E., FISHER, E. I. & MILNER, J. A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18, 567-579.
- SERAFINI, M. 2006. The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine*, 34, 533-535.
- SIDDHURAJU, P. & BECKER, K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101, 10-19.
- SIDE LARBI, K. 2016. Potentiel du contenu Polyphénolique et Huiles Essentielles de Quelques Plantes Médicinales à Activités Anticartilagineuse et Biologiques.
- SINGLETON, V. & ROSSI, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- SOBRATTEE, M. A., NEERGHEEN, V. S., LUXIMON-RAMMA, A., ARUOMA, O. I. & BAHORUN, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579, 200-213.
- SOUNOUGOU, H. 2012. *Etude in vitro des effets antiprolifératif et antiradicalaire d'extraits de graines de Abrus precatorius L. (FABACEAE)*. DOCTORAT, OUAGADOUGOU.
- STAVRIANAKOU, S., LIAKOPOULOS, G. & KARABOURNIOTIS, G. 2006. Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and experimental botany*, 56, 293-300.
- TALIB, W. H., ZARGA, M. H. A. & MAHASNEH, A. M. 2012. Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*, 17, 3291-3303.
- TRIMECH, I., WEISS, E. K., CHEDEA, V. S., MARIN, D., DETSI, A., IOANNOU, E., ROUSSIS, V. & KEFALAS, P. 2014. Evaluation of Anti-oxidant and Acetylcholinesterase Activity and Identification of Polyphenolics of the Invasive Weed *Dittrichia viscosa*. *Phytochemical Analysis*, 25, 421-428.
- VALKO, M., RHODES, C., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160, 1-40.
- WANG, W., BEN-DANIEL, B. & COHEN, Y. 2004. Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology*, 94, 1042-1047.

YASMEEN, H. & HASSNAIN, S. 2016. Comparative analysis of different bioactivities of *Curcuma longa*. *Food Science and Biotechnology*, 25, 811-819.

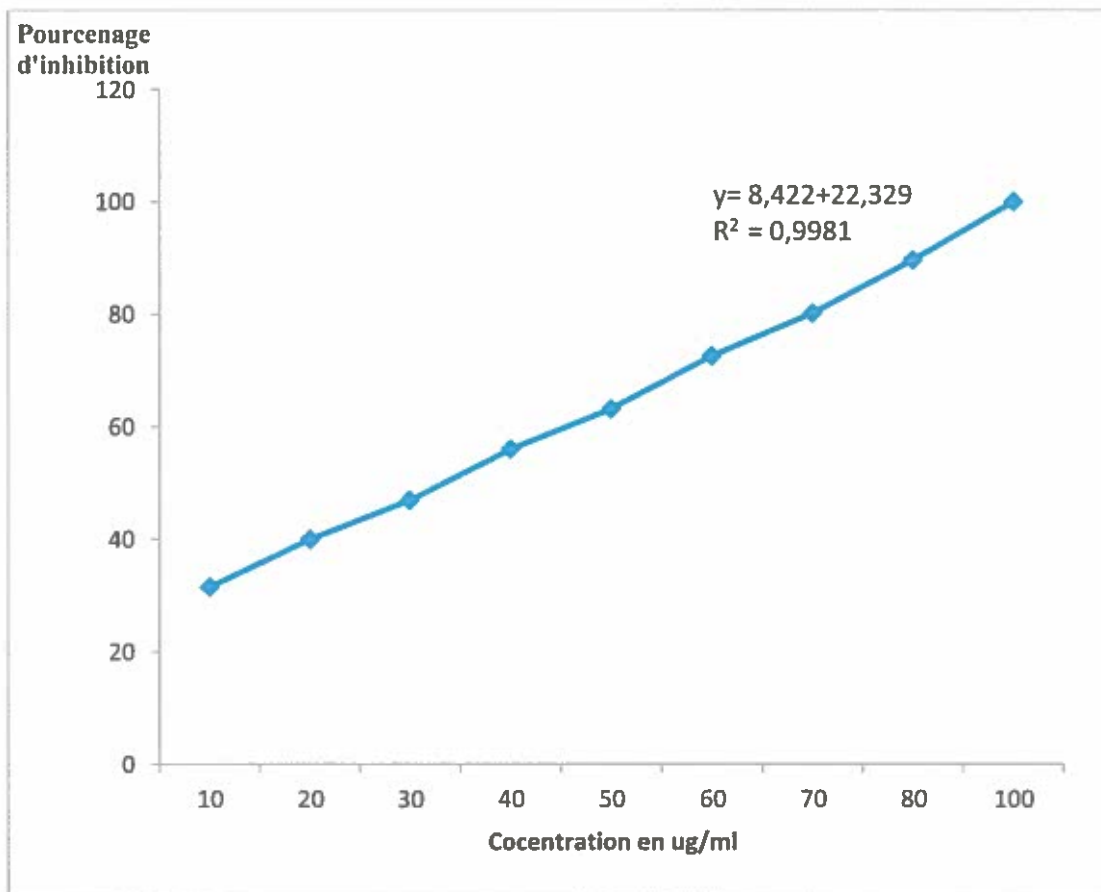


Figure 3 : Variation d'inhibition de DPPH par le BHT.

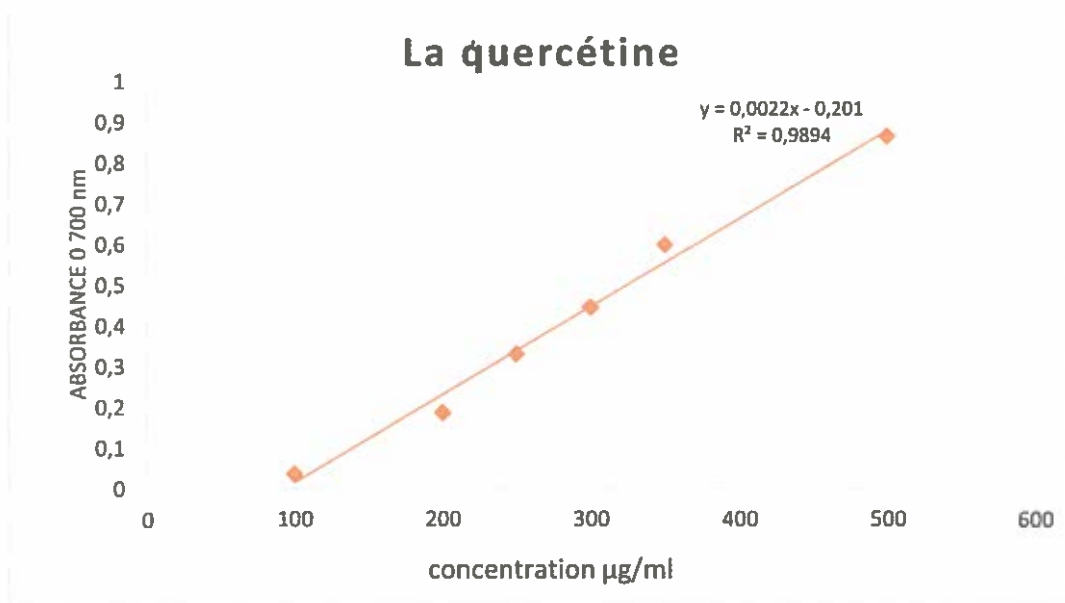


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

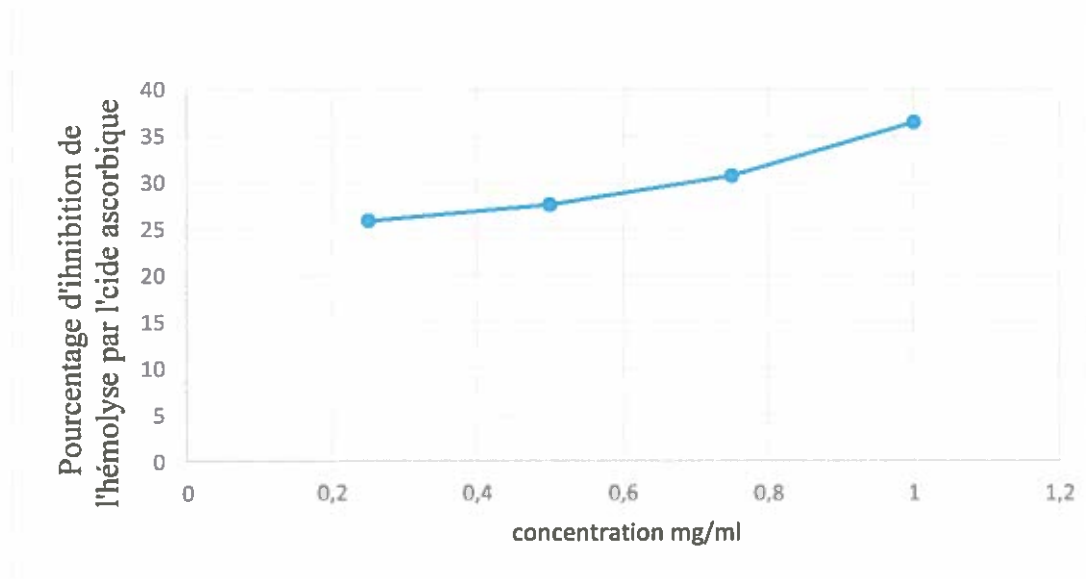


Figure 5 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par l'acide ascorbique.

Le test de DPPH

Tableau I : Préparation des dilutions des 4 extraits

Concentration g/l	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Masse de l'extrait en g	0,0002	0,0004	0,0006	0,0008	0,001
Volume de méthanol ajouté en ml	2	2	2	2	2

Le pouvoir réducteur

Tableau II : Préparation des dilutions pour les 4 extraits

Concentration mg/ml	S M 5 mg/ml	100	200	250	300	350	400	500
Volume prélevé de SM	5	100	200	250	300	350	400	500
Volume d'eau distillée	5	900	800	750	700	650	600	500

Préparation de ferricyanure de potassium [$K_3 Fe (CN)_6$] à 1 %

0,8 g ont été dissouts dans 80 ml d'eau distillée.

Préparation de trichlorure de fer [$FeCl_3$] à 0,1 %

0,05 g de $FeCl_3$ ont été dissouts dans 50 ml d'eau distillée.

Préparation d'acide trichloroacétique (TCA) à 0,61 mM

0,004 g de cristaux de TCA ont été dissouts dans 40 ml d'eau distillée.

Activité anti hémolytique

Tableau III : Préparation des dilutions des 4 extraits

Concentration mg/ml	SM 6 mg/6ml	0,25	05	0,75
Volume de PBS ajouté ml	/	0,75	0,5	0,25
Volume de l'extrait pris	/	0,25	0,5	0,75

Préparation de tampan PBS à 6,6 pour 1 L

1 g de hydrogénophosphate disodique

2 g de sodium dihydrogéné phosphate

8,5 g de chlorure de potassium

Ajuster le Ph s'il est nécessaire

Préparation de tampon PBS à 7,4 à 0,2 1 L

5,75 g NH_2PO_4

1 g KH_2PO_4

1 g KCl

Ajuster le pH s'il est nécessaire.

Résumé

Cette étude porte sur l'évaluation des activités antioxydante et anti hémolytique *in vitro*, des polyphénols totaux, obtenus à partir des extraits de graines de *Pinus halepensis* Mill. et de feuilles de *Dittrichia viscosa* appartenant à la famille des *Pinacées* et *Compositae* respectivement, cultivées dans le parc national de Djurdjura. Elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle comme antiseptique anti-inflammatoire antihelminthique et contre le vieillissement. Le criblage phytochimique de ces extraits a révélé leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes.

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de DPPH avec un pourcentage d'inhibition de 95 %. Quant au test de FRAP, un puissant pouvoir réducteur est révélé par la fraction DVEC (0,374±0,07 mg EQ/g E). Un fort potentiel de piégeage de radical hydroxyle (74,31 %) a été exhibé par *Pinus halepensis* Mill. Par ailleurs, ces composés phénoliques ont montrés une forte inhibition de l'hémolyse des érythrocytes humains dont un pourcentage de 80 % est enregistré par DVEC.

Mots clés: *Pinus halepensis* Mill. , *Dittrichia viscosa*, composés phénoliques, pouvoir antioxydant, activité anti hémolytique.

Summary

This study examined the evaluation of antioxidant and anti-hemolytic activities *in vitro*, total polyphenols, obtained from *Pinus halepensis* Mill seed extracts. And leaves of *Dittrichia viscosa* belonging to the family of *Pinaceae* and *Compositae* respectively, cultivated in the national park of Djurdjura. They are used in traditional medicine as an anti-inflammatory anti-helminthic and anti-aging. The phytochemical screening of these extracts revealed their richness in phenolic compounds and flavonoids. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH method with an inhibition percentage of 95%. As for the FRAP test, a strong reducing power is revealed by the DVEC fraction (0.374 ± 0.07 mg EQ / g E). A high potential for hydroxyl radical trapping (74.31%) was exhibited by *Pinus halepensis* Mill. Moreover, these phenolic compounds have shown a strong inhibition of hemolysis of human erythrocytes, of which 80% is recorded by DVEC.

Key words: *Pinus halepensis* Mill., *Dittrichia viscosa*, phenolic compounds, antioxidant power, anti-hemolytic activity.

ملخص:

فحصت هذه الدراسة تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة ومكافحة انحلال الدم في المختبر، بوليفينول الكلي، التي تم الحصول عليها من مستخلصات بذور بينوس هاليينسيس مطحنة. وأوراق ديتريشيا فيسكوسا تنتمي إلى عائلة بيناسي وكومبوسيتاي على التوالي، المزروعة في الحاضرة الوطنية بجرجرة. تم استخدامها في الطب التقليدي باعتباره مضادة للالتهابات ضد الديدان ومكافحة الشيخوخة. وكشف الفحص النباتي لهذه المستخلصات ثراءها في المركبات الفينولية والفلافونويدات. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بواسطة طريقة DPPH مع نسبة تثبيط 95%. أما بالنسبة للاختبار FRAP، يتم الكشف عن قوة خفض قوية من قبل جزء دفيك (0.374 ± 0.07 ملغ مكافئ / غ). تم عرض قدرة عالية على محاصرة هيدروكسيل جذري (74.31%) من قبل بينوس هاليينسيس مطحنة. وعلاوة على ذلك، أظهرت هذه المركبات الفينولية تثبيط قوي من انحلال الدم من كريات الدم الحمراء البشرية، منها 80% يتم تسجيلها من قبل DVEC

الكلمات المفتاحية: بينوس هاليينسيس ميل، ديتريشيا فيسكوسا، المركبات الفينولية، قوة مضادة للأكسدة، نشاط مضاد للانحلال