

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



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

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

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

ABBAS Kenza & BELHOUT Tinhinane

Thème

*Etude de l'activité hypolipidémiant des polyphénols des
graines de Pinus pinea L sur des rats hyperlipidémiques
induit par le Triton X-100*

Soutenu le : 08 / 07 / 2019

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. ARAB Amar</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>President</i>
<i>M. KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M^{elle}. BELKADI Asma</i>	<i>INGENIEUR</i>	<i>CRD-Saidal. Alger</i>	<i>Co-Promoteur</i>
<i>M^{elle}. BENSMAIL Souhila</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M^{elle}. BENZITOUNE Nour el Imane Houda</i>	<i>Doctorante</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Invitée</i>

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

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

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre promoteur le docteur KADRI NABIL d'avoir accepté de nous encadrer pour notre projet de fin d'études, ainsi que pour son soutien, ses remarques pertinentes et son encouragement. Nos remerciements les plus cordiaux et toutes nos pensées de gratitude à notre Co-promotrice M^{elle} BELKADI Asma qui a codirigé notre projet avec plein de générosité pendant toute la période du stage.

Nous remercions ensuite l'ensemble des membres du jury, qui nous ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention notre travail : M ARAB Amar et M^{elle} BENSMAIL Souhila.

Nous remercions M^{elle} BENZITOUNE Imene pour son soutien et son encouragement tout au long de ce travail, les mots ne peuvent exprimer notre sincère gratitude.

Nous adressons nos remerciements aux nombreuses personnes côtoyées dans les différentes équipes des laboratoires où nous avons réalisé les travaux de recherche de notre projet de fin d'études. Nous avons apprécié l'accueil, le soutien, l'amitié et/ou l'aide multiformes de chacun de vous. Nous voudrions ici exprimer notre gratitude à toutes et à tous.

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

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

J'exprime mes profonds remerciements particuliers à mes deux mamans « Fatima » et « Malika », mes conseillères, et amies fidèles, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous,

A mes chères sœurs Nawel et Salima pour leur encouragement permanent, et leur soutien moral,

A mes chers frères Youcef et Fodel, qui n'ont jamais cessé d'être pour moi un exemple de persévérance, de courage, d'appui et leur encouragement et de générosité, aucune dédicace ne saurait exprimer tout ce que je ressens pour vous, je vous aime

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,
Merci d'être toujours là pour moi,

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

A mes trois âmes sœurs « Amel », « Bina » et « Nabil » je vous aime.

Kenza

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à

Mes parents :

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

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

A mon mari YUCEF, Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour dont tu m'as toujours entouré.

Cher mari j'aimerais bien que tu trouve dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincères.

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

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

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

Tinhinane

Liste des abréviations

Acyl coa : acyl coenzym A

AGL : acide gras libre

ASAT : aspartate aminotransferase

ALAT : alanine aminotransferase

AlCl₃ : trichlorure d'aluminium

Apo B : apolipoprotéine B

Apo C : apolipoprotéine C

Apo E : apolipoprotéine E

AO : obésité androïde

CT : cholestérol total

CM : chylomicrons

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil

EAG : Equivalent acide gallique

EQ : Equivalents de quercétine

FATP1 : fatty acid transport protein 1.

GLUT4 : glucose transporter 4,

HDL : High Density Lipoprotein

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

IDL : intermédiaire density lipoprotein

IRS : insulin receptor substrate,

IKK β : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase

LCAT : lécithine-cholestérol acyltransferase

LDL : Low density lipoprotein

LOX : Lipoxygénase

MoO₄²⁻ : molybdate

MCV : Maladies cardiovasculaires

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

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

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

Nm : Nanometer

Na₂CO₃ : carbonate de sodium

NFκB : nuclear factor kappa B

Ox-LDL : low density lipoprotein oxydé

PLP : phospholipases

PIK3 : phosphoinositol 3 kinase,

PKB/Akt : protéine kinase B/Akt, PKC, protéine kinase C,

R° : Radicaux libres

TG : triglycérides

TX-100 : Triton X-100

VLDL : very low density lipoprotein

WO₄²⁻ : phosphotungstique

μl : Microlitre

Liste des figures

Figure 01 : Air de répartition du pin pignon dans le monde	04
Figure 02 : Répartition de la plantation du pin pignon par wilaya en Algérie.....	05
Figure 03: aspect morphologique des différentes parties de l'arbre	05
Figure 04: chatons males lors de la floraison.....	06
Figure 05: Écrous de pignon en coquille.....	07
Figure 06: les cônes mûrs de pin pignon.....	07
Figure 07: Représentation schématique des différentes étapes de la formation de la strie lipidique.....	15
Figure 08: Acides gras et voie de signalisation de l'insuline.....	16
Figure 09 : graines de <i>Pinus pinea</i> L.....	20
Figure 10: Etapes d'extraction des composés phénoliques des graines de <i>Pinus pinea</i> L.	22
Figure 11: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	24
Figure 12 : Formation du radical cation ABTS ^{•+} à partir de l'ABTS.....	26
Figure 13: (A) injection du triton ; (B) gavage ; (C) récolte du sang par sinus retro orbitaire	29
Figure 14: dissection des rats et récolte d'organes.....	32
Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait polyphenolique	38
Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	39
Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du ABTS ⁺ en fonction de différentes concentrations de l'extrait polyphenolique	41
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	41
Figure 19: Pourcentage de réduction du fer ferrique en fonction de différentes concentrations de l'extrait polyphenolique.....	43

Figure 20 : Pourcentage d'inhibition du fer en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	43
Figure 21 : dosage du cholestérol total(A) ; triglycérides (B) ; HDL-c(C) ; LDL-c (D) ; VLDL (E).....	47
Figure 22: coupe histologique du foie du rat témoin montrant une architecture normale du foie, vu au grossissement ×40	50
Figure 23: coupe histologique du foie d'un rat hyperlipidémique montrant une infiltration lipidiques au niveau des cellules hépatiques sous forme de VL (vacuoles lipidiques) (A) et une dégénérescence granulaire importante (B)	50
Figure 24: coupe histologique du foie d'un rat traité avec l'atorvastatine (10 mg/kg) montrant l'absence presque totale des globules lipidiques, vue au grossissement ×40.....	51
Figure 25: coupe histologique du foie d'un rat traité avec l'atorvastatine (10 mg/kg) montrant l'absence presque totale des globules lipidiques, vue au grossissement ×40.....	51
Figure 26 : Coupe histologique du rat du groupe traité a 200 mg/kg de l'extrait polyphenolique montrant une infiltration graisseuse persistante vu au grossissement ×40	52
Figure 27: Micrographie histologique du groupe V (traitement avec 400 mg/kg de l'extrait) montrant de petites vacuoles lipidiques négligeables et une dégénérescence granulaire moins importante vu au grossissement ×40	52
Figure 28 : La micrographie histologique du groupe II (hyperlipidémie) montrant une infiltration graisseuse excessive et diffuse du myocarde	53
Figure 29 : Micrographie histologique du groupe III (traitement avec l'atorvastatine) montrant un muscle cardiaque sans dégénérescence avec des vacuoles lipidiques négligeables	53
Figure 30 : Micrographie histologique du groupe IV (traitement avec 200 mg/kg de l'extrait) montrant un muscle cardiaque à infiltration graisseuse modérée (A) et des cellules spumeuses (B).....	54

Figure 31 : Micrographie histologique du groupe V (traitement avec 400 mg/kg de l'extrait) montrant un muscle cardiaque à petite vacuoles lipidique qui infiltre le muscle cardiaqu, vu au grossissement $\times 40$ 54

Liste des tableaux

Tableau I : Classification taxonomique de <i>Pinus pinea</i> L.....	03
Tableau II : Propriétés physicochimiques et composition des graines de <i>Pinus pinea</i> L.	08
Tableau III : les principaux éléments cliniques et biologiques d'une Cholestase.....	11
Tableau IV : Classification des hyperlipidémies selon Fredrickson	12
Tableau V : Poids d'extrait sec et rendement correspondant de l'extrait polyphenolique à partir des graines de <i>Pinus pinea</i> L	38
Tableau VI : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/ gE) et en flavonoïdes (mg EQ/ gE) de l'extrait polyphenolique.....	39
Tableau VII : Résultat du test antioxydant exprimant la concentration efficace 50% en mg/ml pour le DPPH	42
Tableau VIII : Résultat du test antioxydant exprimant la concentration efficace 50% en mg/ml pour l'ABTS	44

SOMMAIRE

Introduction générale.....	01
-----------------------------------	-----------

Synthèse bibliographique

I. Présentation de l'espèce.....	03
I.1. Taxonomie	03
I.2. Aire de Répartition	03
I.2.1 Répartition en Algérie.....	04
I.3. Caractères botaniques	05
I.4. Structure de la graine	06
I.5. La composition chimique.....	07
I.6. Usage et activité biologique.....	09
II. l'hyperlipidémie.....	10
II.1. Généralités	10
II.2 Les facteurs de risques.....	10
II.2.1 Les facteurs de risques primaires.....	10
II.2.2 Les facteurs de risques secondaires	11
II.3 classification de l'hyperlipidémie.....	12
II.4. Complications de l'hyperlipidémie	14
II.5. Traitement de l'hyperlipidémie	17
II.5.1 Substances synthétiques	17
II.5.2 Substances naturelles	17

Matériels et méthodes

I. Matériel.....	20
I.1. Matériel végétal	20
I.2. Matériel animal et conditions d'élevage	20
II. Méthodes	20

II.1 préparation du matériel végétal	21
II.1.1 Extraction des composés phénoliques	21
II.2. Analyse phytochimique	22
II.2.1. Dosage des polyphenols totaux	22
II.2.2. Dosage des flavonoïdes	23
II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante	23
II.2.3.1. Mesure de L'activité anti-radicalaire (DPPH).....	23
II.2.3.2. Test ABTS ⁺	25
II.2.3.3. Réduction du Fer : FRAP	26
II.3. Etude de l'activité hypolipémiante	28
II.3.1. Matériel animal et induction de l'hyperlipidémie	28
II.3.2. Protocole expérimental	28
II.3.3. Collecte du sang et d'organes	28
II.3.4. Dosage des paramètres lipidiques sanguin	29
II.4. Etude histopathologique	32

Résultats et discussion

I. Le rendement d'extraction	36
II. Le taux en polyphenols totaux et flavonoïdes	37
III. Evaluation de l'activité antioxydante	38
IV. Etude de l'effet hypolipémiant	44
IV.2. Etude histopathologique.....	49
IV.2.1. Histologie du foie.....	49
IV.2.2. Histologie du cœur	52
Conclusion et perspectives.....	56

Références bibliographiques

Annexes

introduction

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires représentent un enjeu majeur de santé publique et la deuxième cause de mortalité dans la population générale après le cancer (**Touze, 2007**). Ces maladies regroupent la maladie coronaire, l'accident vasculaire cérébral ischémique, l'artériopathie des membres inférieurs (**Baudin et al, 2009**). Elles sont des complications, le plus souvent tardives de l'athérosclérose, phénomène d'obstruction des artères suite à l'accumulation dans la paroi artérielle des lipides contenues dans le LDL- cholestérol(**Hansel et al, 2011**). Afin de prévenir le décès et l'handicap liés aux maladies cardiovasculaires, le dépistage et la prise en charge des dyslipidémies est devenue une action prioritaire depuis le début des années 80. Les modalités de prise en charge incluent les règles hygiéno-diététiques en première intention puis son association avec les traitements médicamenteux en cas d'échec d'atteinte d'objectifs thérapeutiques. Cependant la consommation des médicaments hypolipémiants et notamment les statines est devenue une préoccupation majeure pour les professionnels de santé. D'une part, le coût pour la collectivité, d'autre part, la survenue depuis 2007 d'une polémique concernant l'efficacité et l'innocuité des statines, remettant en question les indications de leur prescription (**Morozova et al, 2004**).

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux effets thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents thérapeutiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants (**Ghedira, 2005**).

Parmi ces plantes on a les graines de pin pignon qui sont issues de l'un des arbres les plus communs, à la fois en Europe et en Amérique du Nord, mais c'est surtout dans la zone méditerranéenne où il obtient la plus haute importance en matière de production et de consommation (**Nasri et Triki, 2007**). Il fait partie des conifères de la famille des Pinaceae. Les constituants chimiques sont principalement des terpénoïdes, des flavonoïdes, des lignanes, des phénols, des stéroïdes, des acides gras et des acides gras alcools. Les extraits bruts et divers métabolites possèdent diverses bioactivité, notamment, antitumorale,

Introduction générale

antiulcérogène, anti-inflammatoire, antihypertenseur, antitussif, antimicrobien et activités du système nerveux central(Fekih, 2019). Comme les praticiens traditionnels ont utilisé cette plante pour traiter les affections hyperlipidémiques, il a donc été jugé utile d'étudier l'allégation d'une hyperlipidémie induite expérimentalement. C'est dans cette optique que les graines locales de *Pinus pinea* L ont été choisies.

Ce travail s'inscrit donc dans le cadre de la valorisation de *Pinus pinea* L d'intérêt thérapeutique, où le but de cette étude est d'évaluer l'effet des extraits polyphénoliques des graines de pin pignon sur une hyperlipidémie induite par le triton X-100 sur des rats, complétée par une étude histopathologique réalisée sur le foie et le cœur de ces derniers.

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

✚ la première partie est une synthèse bibliographique consacrée à la description botanique de la plante et aux propriétés biologiques de *Pinus pinea* L, ainsi qu'une mise au point sur l'hyperlipidémie.

✚ la deuxième partie est la partie expérimentale qui traite :

-la quantification des composés phénoliques et les flavonoïdes à partir des graines de *Pinus pinea* L.

-l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits en utilisant la méthode DPPH, ABTS⁺ et FRAP.

-Induction d'une hyperlipidémie aiguë par l'injection du triton X-100, suivie d'un traitement par l'extrait polyphénolique des graines de *Pinus pinea* L

✚ Enfin, dans la troisième partie, nous avons rapporté les résultats obtenus entre autre :

-les rendements, les teneurs des composés phénoliques et flavonoïdes.

-La détermination in vivo de l'effet de cet extrait sur l'hyperlipidémie induite par le triton X-100, en effectuant un bilan lipidique, complété par une étude histopathologique réalisée sur le foie et le cœur des rats.

Partie bibliographique

Synthèse bibliographique

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

I.1. Taxonomie

Parmi les Gymnospermes, le Pin parasol appartient à la famille des Pinacées dont onze genres reconnus et 225 espèces, ce qui en fait la plus grande famille de plantes à graines non en fleurs (Charrier *et al*, 2004 ; Gernandt *et al*, 1999). Le genre *Pinus* est divisé en deux sous-genres : *Strobus* (l'haploxyton, ou broches souples) et *Pinus* (le diploxyton, ou broches dures) (Gernandt *et al*, 2005).

Le sous-genre *Pinus* est à son tour divisé en 6 sections, dont la section *Pinea* comprenant uniquement l'espèce *Pinus pinea* L. La position taxonomique du pin pignon est la suivante (Sbat et Hadjib, 2016) :

- ✚ Nom botanique : *Pinus pinea* L.
- ✚ Nom français : Pin pignon.
- ✚ Nom Arabe : Senouber El-Tamri.
- ✚ Nom berber : Azoumbi

Tableau I : Classification taxonomique de *Pinus pinea* L. (Sbat et Hadjib, 2016)

Classification	
➤ Embranchement	Spermaphytes
➤ Sous Embranchement	Gymnospermes
➤ Classe	Coniféroopsidae
➤ Ordre	Coniférales
➤ Famille	Pinaceae
➤ Genre	<i>Pinus</i>
➤ Espèce	<i>Pinea</i>

I.2. Air de Répartition

La superficie totale couverte par le Pin pignon dans le monde est estimée à 600 000 ha (75% en Espagne, 9% au Portugal, 8% en Turquie, 7% en Italie, 3% en Tunisie, 0,5% au Maroc et le reste en Grèce, Liban, Algérie et en France). Son aire de diffusion naturelle est principalement la Méditerranée septentrionale, mais il est très répandu sur tout le pourtour méditerranéen (Nasri *et al*, 2005). Les pinèdes les plus étendues, en partie d'origine naturelle, se trouvent dans la péninsule Ibérique avec près de 400 000 ha (Dominguez-Lerena *et al*,

Synthèse bibliographique

2006), en Espagne, Portugal, Turquie et en Italie (Penpoul et Laplace, 2017), jusqu'aux côtes méridionales de la mer Noire, où, dans certains secteurs, l'espèce est probablement indigène. Cette aire est illustrée dans la figure (01) (Celestino *et al*, 2018).



Figure 01 : Aire de répartition du pin pignon dans le monde (Sbat et Hadjib, 2016).

I.2.1 Répartition en Algérie

Le Pin pignon a été introduit depuis fort longtemps en Afrique du Nord. En Algérie, les plantations de Pin pignon ont été réalisées entre 1935 et 1974, couvrant une superficie de 4448 ha. Les wilayas concernées sont : Constantine, Bouira, Mostaganem, Médea et Annaba. (Draouet, 2015) (Figure 02). Il existe actuellement de très belles pineraies à pignes datant des années 1970, notamment à Oran (reboisement de Macta, à Chlef (Abou El Hassen) et à Alger (Bouchaoui) et à Blida (Chrèa). Parmi les reboisements les plus récents, ceux de Sidi lakhdar où le pin pignon est mêlé au pin d'Alep et à quelques Eucalyptus. D'autres reboisements existent dans les zones littorales à l'Est du pays sous forme de petits bouquets à proximité des habitations. D'après les résultats de l'inventaire forestier national (IFN) réalisé en 2000, les trois quarts des plantations de pin pignon concerne la wilaya de Constantine. Elles sont localisées au niveau de la région de Djebel El Ouahch occupant une superficie de 2278 ha (Fekih *et al*, 2019).

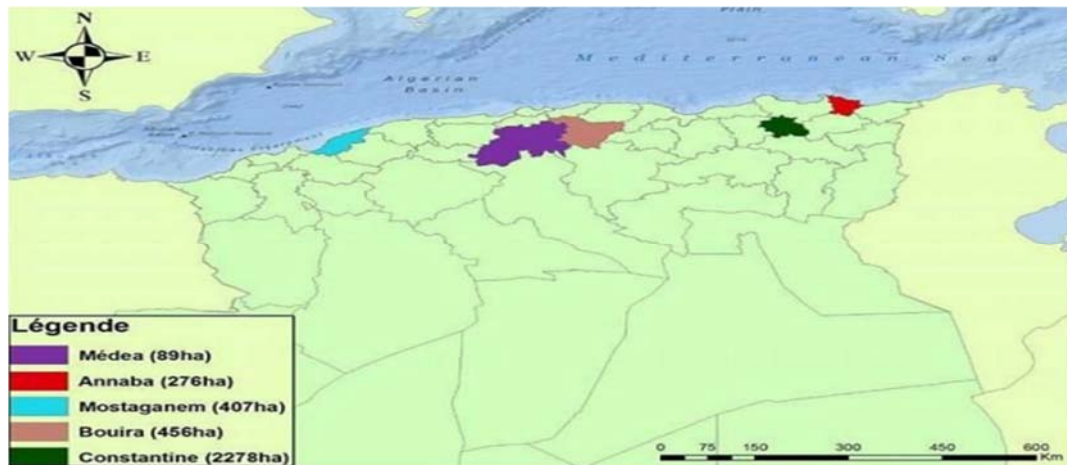


Figure 02 : Répartition de la plantation du pin pignon par wilaya en Algérie (DGF IFN 2008).

I.3. Caractères botaniques

Le Pin pignon est une espèce de conifères héliophile par excellence et exige une pleine lumière. Sa diffusion est liée au climat chaud et lumineux des côtes méditerranéennes (Macchioni *et al*, 2003). Le Pin pignon est un arbre à port typiquement “ en parasol ”. Il peut atteindre une hauteur de 30 m et plus de 6 m de circonférence. Son tronc est cylindrique, rectiligne et se divise rapidement en branches (Sbat et Hadjib, 2016). Sa longévité peut atteindre 200 à 250 ans, mais dans quelques régions elle peut dépasser 400 ans. La croissance est monocyclique avec les rameaux primaires d’un gris verdâtre. Les aiguilles, d’un vert glauque, réunies sur les rameaux sont généralement fasciculés par deux. Elles sont longues de 10 à 20 cm et épaisses de 1,5 à 2 mm (figure 03) (Charrier, 2004).



Figure 03 : Aspect morphologique des différentes parties de l’arbre (originale).

Synthèse bibliographique

Les bourgeons sont cylindriques, pointue avec des écailles réfléchies, d'un brun clair, frangées de blanc. Les arbres, monoïques, forment des inflorescences cylindriques. L'époque de floraison est comprise entre mai et juin. Les chatons mâles placés à la base des rameaux de l'année sont des inflorescences cylindriques, de couleur jaune verdâtre teinté de brun. Elles sont formées d'écailles imbriquées, avec de nombreuses étamines (**Charrier, 2004**).



Figure 04: Chatons mâles lors de la floraison (originale).

I.4. Structure de la graine

En réalité ces pignons de pin sont les amandes des graines extraites des cônes de *Pinus pinea* L. Ils sont contenus dans des coquilles très dures lignifiées, appelés pignons coques, graines ou encore pignons noirs. Lorsqu'ils sont séparés de leur coquille et que la fine pellicule qui les recouvre est enlevée, ils deviennent comestibles et se nomment pignons blancs ou amandes (**Penpoul et Laplace, 2017**).

La graine est un organe de reproduction et la structure protectrice de l'embryon végétal. Elles sont constituées essentiellement de cotylédons et de l'albumen qui sont des substances de réserve nourricière, destinée au développement du futur embryon. Ces réserves comportent de l'amidon, des lipides et la plus grande partie est constituée de protéines. Les graines de pin pignon sont entourées d'un tissu contenant des matières de réserves (l'endosperme ou l'albumen), et protégées par un tégument plus ou moins épais et imperméable. L'embryon est constitué de Cotylédons, Gemmule, Tigelle et de Radicule. Ces diverses structures constitutives de la graine sont d'origine ovarienne soit de l'ovule ou de la paroi de l'ovaire (**Kadri, 2014**).

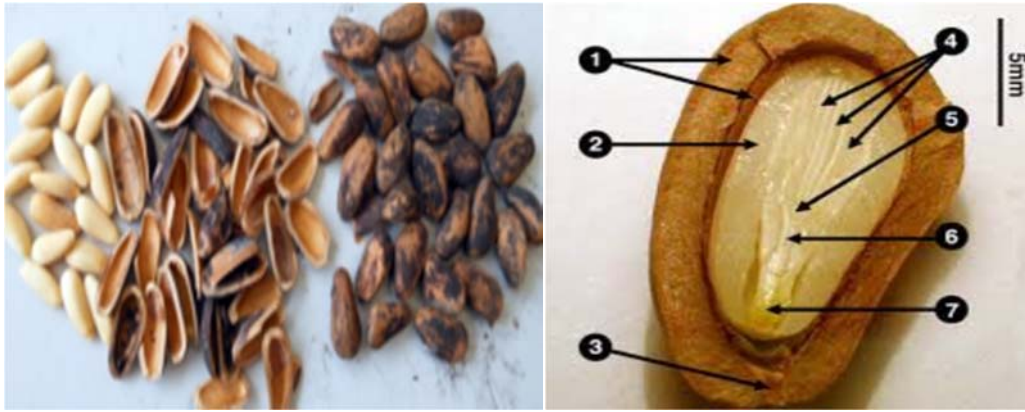


Figure 05: Écrous de pignon en coquille + les noyaux (à gauche) et la coupe longitudinale d'une graine de pin pignon (à droite) ; 1: Téguments ; 2: Endosperme ; 3: Hile ; 4: Cotylédons ; 5: Gemmule ; 6: Tigelle ; 7: Radicule. L'embryon est constitué de l'ensemble des pièces 4, 5, 6 et 7. (Kadri, 2014)

Les cônes sont solitaires (rarement réunis par 2 ou 3), arrondis, ovoïdo-coniques, de 8 à 14 cm de long et de 7 à 10 cm de large. Ils possèdent des écailles en écusson renflé, à ombilic peu saillant. Les graines, grosses à coque ligneuse sont groupées par deux à la base de chacune des écailles. Elles mûrissent à l'automne de la troisième année, leur production est abondante seulement tous les 3 à 4 ans (Draouet, 2015).



Figure 06: Les cônes mûrs de pin pignon (originale).

I.5. La composition chimique

Les graines de *Pinus Pinea* L sont constituées de 31,6% de lipides, de 5.15% de sucres solubles totaux et une valeur énergétique de 583 kcal / 100 g. *Pinus Pinea* L est riches en lipides, la quantité des huiles est en moyenne 44,9%. Les acides oléiques et linoléiques sont les principaux acides gras insaturés, tandis que les acides palmitiques, stéariques et

Synthèse bibliographique

lignocérique sont les principaux acides gras saturés. Les éléments minéraux tels que le potassium, le phosphore et le magnésium, et vitamines telle que l'acide ascorbique sont aussi des éléments prédominants présents dans les graines de *Pinus Pinea* L.(tableau. II) (Nergiz et Dönmez, 2004 ; Kadri *et al*, 2015).

Tableau II : Propriétés physicochimiques et composition des graines de *Pinus pinea* L (Nergiz et Dönmez, 2004 ; Kadri *et al*, 2015).

Composition	Les valeurs nutritives
Humidité	5%
Cendre	4,5%
Lipides	44,9%
Protéines	31,6%
Sucres	5,15%
Acide ascorbique	2,50 ±0,014 mg/100g
Potassium	713± 1,14 mg/100g
Phosphore	512 ±5,56 mg/100g
Magnésium	325 6,18 mg/100g
Valeur énergétique	583 kcal/100 g
Acides gras insaturés :	
Acide oléique	38,60 ±0,59%
Acide linoléique	47,6 ±0,3%
Acides gras saturé	
Palmitique	6,49 ±0,078%
Stearique	3,47± 0,1%
Lignocérique	3,02 ±0,02%
Polyphénols totaux	7,99 ± 0,211%
Flavonoïdes	2,17 ± 0,118%

Synthèse bibliographique

I.6. Usage et activités biologiques

Outre la valeur industrielle de son bois, le pin pignon est apprécié pour sa production fruitière. On l'emploie en confiserie et en pâtisserie. Sa saveur délicate et sucrée parfume les desserts (par exemple pilé avec du miel) et divers plats. On l'accommode notamment avec bonheur dans les entrées avec de la laitue (*Lactuca sativa*) ou de la scarole (*Lactuca serriola*) accompagnée de lardons et de croûtons. C'est un ingrédient typique de la cuisine méridionale. Il accompagne des plats salés ou sucrés en Espagne, en Italie, en Turquie, en Syrie, au Liban et en Égypte ainsi qu'en Algérie (**charrier, 2004**).

On a prêté au pignon des vertus médicinales aujourd'hui tombées en désuétude. Les lipides présents dans les graines, spécialement l'acide linoléique, a un effet bénéfique sur les lipides sanguins, abaissant la pression artérielle et le cholestérol sérique. La valeur nutritionnelle de l'acide linoléique est en raison de son métabolisme au niveau des tissus qui produit les prostaglandines de type hormone (**Nergiz et Dönmez, 2004**). Les Pinus sont utilisés en médecine traditionnelle algérienne. Ils sont le plus souvent utilisés comme : Antiseptique puissant à action dynamisante ; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires. Rubéfiant et balsamique, efficace dans les affections pulmonaires, la grippe, la sinusite, les rhumatismes (**Seladji, 2014**).

L'huile essentielle de *P. pinea* L possède des activités antifongiques et phytotoxiques. Elle est utilisée comme pesticides et fongicides pour son origine naturelle, ce qui confère plus de sécurité pour l'homme et l'environnement (**Amri et al, 2012**). D'autant plus l'huile essentielle des aiguilles de pin est utilisée dans les parfumeries, savonneries ainsi que dans la formulation de préparations de drogues (**Kadri, 2014**). Les extraits de leurs aiguilles (écorce, aiguille, cône et résine) ont démontré plusieurs activités biologiques: le traitement de maladies telles que rhumatismes, bronchites et hypotension artérielle, anti-inflammatoires, antioxydantes, antiseptiques et activités antimicrobiennes (**Fekih, 2019**).

Synthèse bibliographique

II. Hyperlipidémie :

II.1. Généralités

L'hyperlipidémie regroupe l'ensemble des augmentations quantitative d'une ou plusieurs classes de lipoprotéines plasmatiques, elle s'accompagne le plus souvent d'une modification qualitative des lipoprotéines, ce qui donne des hyperlipoprotéïnémies, hypercholestérolémies, hypertriglycéridémies, diminution du HDL-cholestérol et une augmentation du LDL-cholestérol. Ce qui se traduit sous forme de modifications pathologiques. Les manifestations cliniques de la dyslipidémie sont rares. Elles sont le plus souvent caractérisées par des signes dermatologiques à type de xanthomes, xanthélasma ou gérontoxon (**Thiombiano et al, 2016**).

Les dyslipidémies sont largement associées aux maladies cardiovasculaires et notamment l'athérosclérose, au syndrome métabolique, au diabète ou à l'obésité. Il est donc essentiel d'évaluer la présence d'une dyslipidémie chez un patient présentant l'une de ces pathologies (**Whitfield, 2017**).

II.2 Les facteurs de risques

Les dyslipidémies peuvent être primitives génétiques (d'origine constitutionnelle) pouvant survenir chez l'enfant, elles peuvent intervenir dans le cas d'une hyperlipidémie familiale. Le plus souvent elles apparaissent chez l'adulte et sont liées à des conditions environnementales (alimentation et mode de vie). Elles peuvent avoir une origine secondaire, due à un état pathologique ou due à une iatrogénie (**Boularab, 2018**).

II.2.1 Les facteurs de risques primaires

Il semble toutefois irréfutable que dans certains cas un problème génétique, provoquant un dérèglement du métabolisme serait la cause de dyslipidémie. Un défaut au niveau du code génétique se traduit au niveau des enzymes vont être responsables d'un taux de lipides significativement différent (**Ruiz, 2000**). Il peut être monogénique: un seul gène défectueux ou polygénique: plusieurs gènes défectueux (**Shattat, 2015**).

Le gène muté va augmenter la présence d'un facteur de risque qui est lui-même directement responsable de la maladie : anomalies moléculaires de gènes d'apolipoprotéines, d'enzymes ou de récepteurs intervenant dans les trois voies de régulation du métabolisme des lipoprotéines, définissant une maladie monogéniques qui est celui de la fameuse

Synthèse bibliographique

hypercholestérolémie familiale, responsable d'une athérosclérose coronarienne sévère et précoce (Ruiz, 2000).

II.2.2 Les facteurs de risques secondaires

II.2.2.1 Cholestase intra hépatique

Une Cholestase intrahépatique est liée à une obstruction des voies biliaires intrahépatiques ou à une diminution de la sécrétion biliaire par atteinte des hépatocytes. Il s'agit d'une maladie multifactorielle, impliquant principalement des facteurs génétiques et hormonaux. Des facteurs exogènes peuvent également moduler l'expression de la maladie. (Sentilhes, 2008). Ce syndrome inclut de nombreux signes clinico-biologiques différents rassemblés dans le **tableau III** (Valla, 2013).

Tableau III : Les principaux éléments cliniques et biologiques d'une Cholestase.

Signe cliniques	Signe biologiques (plasma ou sérum)
-Ictère à bilirubine conjuguée	Augmentation des acides biliaires
-Prurit	Augmentation de l'activité phosphatase alcaline
-Amaigrissement ou steatorrhée	Augmentation de l'activité gamma-glutamyl transpeptidase
-Carence en vitamine A D E K (Cholestase prolongé)	Augmentation de l'activité 5 nucléotidases Augmentation de l'activité des transaminases ALAT et ASAT (Cholestase aigue)

Le principal symptôme, présent dans environ 95% des cas, est un prurit et /ou un ictère. Une stéatorrhée peut être présente d'une façon secondaire à une malabsorption des graisses avec un déficit en vitamine K (Sentilhes, 2008).

L'activité sérique des aminotransférases (ALAT, ASAT) est le plus souvent augmentée. La concentration sérique des acides biliaires, l'activité sérique des phosphatases alcalines et de la gammaglutamyl transpeptidase sont habituellement augmentées. Les LDL- et HDL-cholestérol sont respectivement augmentés, et diminués dès l'apparition du prurit témoignant d'une relation entre cholestase intrahépatique et dyslipidémie (Sentilhes, 2008).

Le taux plasmatique des esters de cholestérol et l'activité de la lécithine cholestérol acyl-transférase (LCAT) augmentent. Cette enzyme synthétisée par le foie joue un rôle dans

Synthèse bibliographique

l'estérification des acides gras au cholestérol et un rôle fondamental dans la synthèse et la dégradation des lipoprotéines. (Sentilhes, 2008).

II.2.2.2 Régime alimentaire riche en matière grasse

La relation entre cholestérolémie et/ou concentration sérique de LDL-cholestérol et maladie coronaire a été mise en évidence dans de nombreuses études épidémiologiques.

Les acides gras saturés stimuleraient la synthèse du cholestérol endogène et inhiberaient son excrétion. D'une part, ils pourraient être responsables d'une diminution de l'expression des récepteurs aux apolipoprotéines à la surface des hépatocytes et, d'autre part, leur incorporation dans les phospholipides membranaires des cellules pourrait nuire à la fluidité des membranes, déstabilisant ainsi l'action de ces récepteurs et ainsi à l'épuration des LDL (Walrand *et al*, 2010).

A l'inverse, les acides gras insaturés stimuleraient son excrétion et sa transformation en sels biliaires (Attia-Skhiri *et al*, 2009). Les huiles rendues solides par hydrogénation, à l'intérieur desquelles on trouve des acides gras trans auraient des effets encore plus néfastes (augmentation encore plus forte du taux de LDL et diminution marquée des HDL) (Bruckert, 2001 ; Chardigny et Malpuech-Brugere, 2007; Attia-Skhiri *et al*, 2009). D'autant plus, les triglycérides (graisses), présents en trop grande quantité dans le sang inhiberaient les récepteurs LDL des cellules. On assisterait alors au même effet que dans une hypercholestérolémie familiale, mais dû cette fois à l'alimentation (Cugnet *et al*, 2008; Varret *et al*, 1997).

II.3 classification de l'hyperlipidémie

La classification internationale des dyslipidémies ou classification de Fredrickson *et al*. (1967) est représentée dans le tableau IV.

Tableau IV : Classification des hyperlipidémies selon Fredrickson

	Cholestérol	TG	LP	Type
I	↑	↑↑↑	CM	Hypertriglyceridemie exogène
II a	> 2,5 g/l	N	LDL	Hypercholestérolémie pure
II b	↑	↑↑↑	VLDL+LDL	Dyslepidemie mixte
III	↑	↑↑↑	IDL	Dyslipidémie mixte
IV	N	↑↑↑	VLDL	Hypertriglyceridemie endogène

Synthèse bibliographique

V	↑	↑ ↑ ↑	VLDL+CM	Hypertriglyceridemie endo/exogène
---	---	-------	---------	-----------------------------------

On en décrit six phénotypes (I, IIa, III, IV, IIb, V) dont quatre sont liés à l'élévation d'une seule lipoprotéine :

- ✚ **L'hyperlipoprotéinémie de type I** : augmentation des chylomicrons, qui est due à un défaut génétique (déficit en lipoprotéine lipase) qui entraîne un ralentissement important du catabolisme des lipoprotéines riches en TG, et notamment des chylomicrons, ou de son activateur l'apo C-II (co-facteur activateur nécessaire à l'activité de la lipoprotéine lipase). Le dépôt de graisses dans la peau représente la manifestation clinique caractéristique de la maladie (**Jain, 2007**).
- ✚ **L'hyperlipoprotéinémie de type IIa** : augmentation des LDL, dite aussi hypercholestérolémie pure ou familiale, elle est à l'origine due aux altérations génétiques qui touchent le gène codant pour la synthèse des récepteurs des LDL (ou R-LDL) qui sont de haute affinité aux LDL, cette affection empêche la capture cellulaire des LDL, favorisant son accumulation dans le sang (**Varret et al, 1997**). Ces personnes présentent un risque élevé de développer une maladie coronarienne prématurée (**Jain, 2007**).
- ✚ **L'hyperlipoprotéinémie de type III** : Elle entre dans le groupe des hyperlipidémies mixtes, elle est rare et très athérogène, au niveau des artères coronaires et périphériques. L'analyse de la composition lipidique des VLDL, montre que ces lipoprotéines sont enrichies en cholestérol. Un variant Apo E anormale qui n'est pas reconnu par les récepteurs E, est exprimé à la place de l'Apo E normale. On aboutit ainsi à un trouble de la capture des résidus de chylomicrons, d'IDL et les VLDL au niveau hépatique et à une augmentation de leur concentration plasmatique (**Evans et al, 2009**).
- ✚ **Hyperlipidémie de type IV** : Ce type représente 30% des dyslipidémies, fréquemment observée chez les sujets en surcharge pondérale. Les TG d'origine endogènes (VLDL) sont élevées (hypertriglycémie endogène), et les concentrations plasmatiques du CT et des LDL sont normales et celles du HDL basses. Une hypertriglycémie est habituellement consécutive aux anomalies de la lipoprotéine lipase et à l'insulinorésistance, cette insulinorésistance favorise la

Synthèse bibliographique

lipolyse. Les acides gras libérés en excès sont ré-estérifiés en triglycérides, ensuite utilisés pour la formation de VLDL dans le foie. Le catabolisme retardé surtout du fait d'une activité réduite de l'enzyme LPL qui permet l'hydrolyse des particules de VLDL, induit l'augmentation de la concentration sérique de VLDL, et une diminution des HDL (**Gupta et al, 2011; Shattat, 2015**).

Et deux à l'élévation de deux lipoprotéines :

✚ **Hyperlipoprotéïnémie type IIb** : C'est une hyperlipidémie mixte et fréquente, mais dont la définition recouvre également HCF, maladie génétiquement transmise sur le mode monogénique autosomique dominante. En plus du cholestérol, les TG sont également légèrement augmentées. La cause de cette maladie réside vraisemblablement dans une surproduction d'Apo B-100, qui augmente la synthèse de VLDL et aboutit donc à une formation accrue de LDL. La dysbêtalipoprotéïnémie familiale prédispose au déclenchement d'une hyperlipoprotéïnémie de type III (**Soutar et Naoumova, 2007**).

✚ **Hyperlipidémie de type V** : Il s'agit d'une affection exceptionnelle, qui réunit les caractéristiques de l'hyperlipidémie de type I et de type IV. Elle associe donc une élévation des chylomicrons et des VLDL. Il existe une augmentation du CT et des TG, celle-ci étant variable selon l'apport alimentaire. Une lipolyse défectueuse et une surproduction de VLDL en sont responsables. Les causes peuvent être génétiques ou peuvent être secondaires au diabète sucré, à l'obésité ou à la consommation d'alcool (**Jain, 2007**).

II.4. Complications de l'hyperlipidémie

II.4.1 L'athérosclérose

Selon l'Organisation mondiale de la santé les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. L'athérosclérose est une maladie grave qui est caractérisée par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les artères (**Mattern et Hardin, 2007 ; Kim et al, 2012**).

L'hyperlipidémie favorise l'augmentation de la captation et de la synthèse des LDL par les cellules endothéliales, à l'origine d'une accumulation sous-endothéliale de LDL. La survenue préalable d'une dysfonction endothéliale conduit à une production d'espèces

Synthèse bibliographique

réactives de l'oxygène (ROS), qui vont attaquer la partie lipidique et protéique et les emprisonnées dans l'intima ; les lipoprotéines ainsi modifiées seront reconnues par le système immunitaire comme étant une substance étrangère et les macrophages de l'espace subendothéliale captent des quantités importantes de cholestérol en incorporant les Ox-LDL) (Paul et Baudin, 2009). Les macrophages se surchargent en cholestérol et se transforment en cellules spumeuses (figure 07) qui vont s'accumuler dans la paroi artérielle, induisant a la formation des plaques composées de dépôts lipidiques riches en cholestérol (athérome) enveloppés dans une gangue fibreuse (sclérose) (Duriez, 2004), qui évolue et provoque la formation d'un thrombus occluant la lumière du vaisseau sanguin.(Saile et Hassan, 2007), et susceptible de provoquer une occlusion vasculaire dont les conséquences peuvent être fatales (Glorian et Limon, 2007).

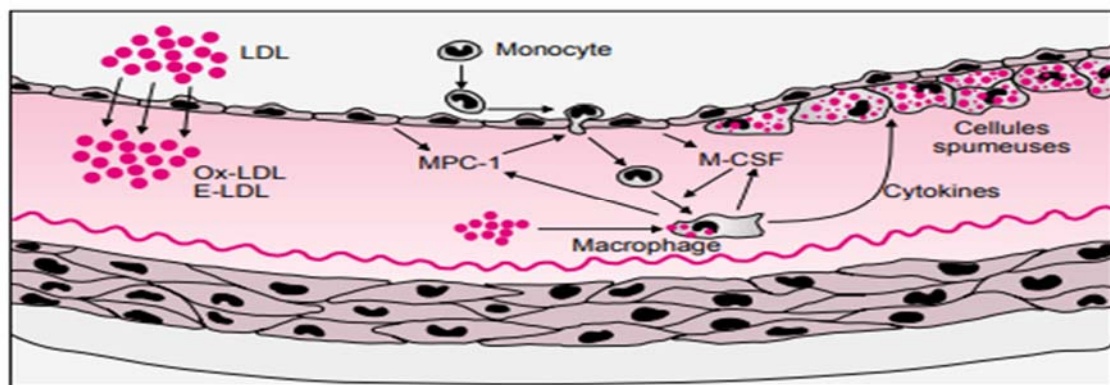


Figure 07: Représentation schématique des différentes étapes de la formation de la strie lipidique (Tedgui et Mallat, 2001).

II.4.2 Diabète de type 2

Le diabète de type 2 ou l'insulinorésistance se définit par l'impossibilité de l'hormone à exercer ses effets physiologiques à une concentration donnée sur ces principales cibles. Le dysfonctionnement du métabolisme des lipides et plus particulièrement des AGL est un élément essentiel menant à l'insulinorésistance (Magnan, 2006).

L'action intracellulaire de l'insuline semble être inhibée par une accumulation de dérivés lipidiques tels que les diacy-glycérols, acyl-CoA et les céramides. Les mécanismes moléculaires de cette inhibition mettraient en jeu la voie de l'insuline permettant la translocation à la membrane des transporteurs de glucose (GLUT 4) et un certain nombre d'enzymes importants dans le métabolisme intracellulaire des glucides (ex : glycogène

Synthèse bibliographique

synthase). L'inhibition de ces facteurs va réduire la sensibilité du tissu à l'insuline et diminuer les capacités d'utilisation du glucose (Walrand *et al*, 2010).

Comme illustré dans la **figure 08**, L'excès en métabolites des acides gras (céramides, acyl-CoA, diacylglycérol) active des sérine/thréonine kinase (PKC, NFκB, IKKβ), qui phosphoryle les IRS et la PKB/Akt ce qui inhibe la voie de signalisation de l'insuline (Megan, 2006; Summers, 2006).

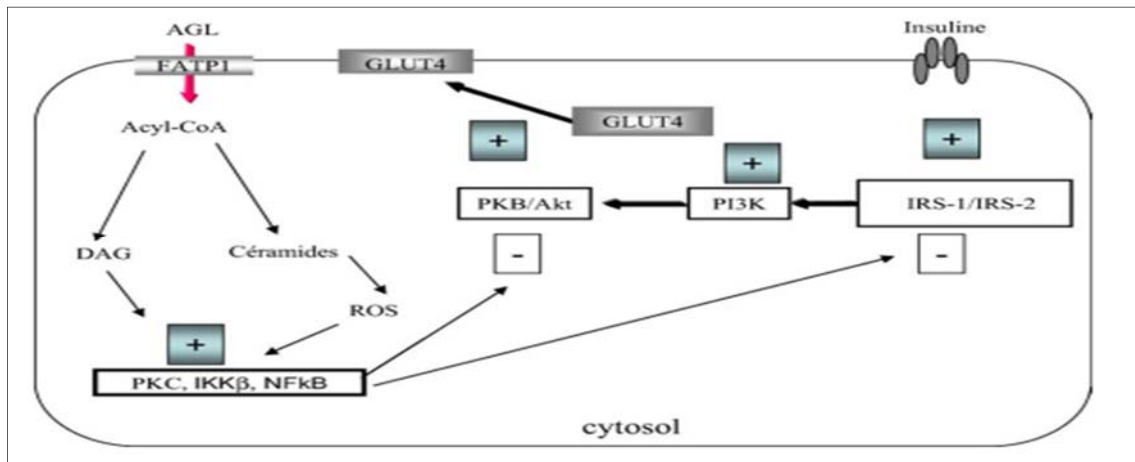


Figure 08: Acides gras et voie de signalisation de l'insuline (Summers, 2006).

II.4.3 Obésité

La dyslipidémie à travers les différentes études de littérature est notée chez 20 à 40% des patients obèses. Le déséquilibre alimentaire, en faveur d'un apport énergétique supérieur aux dépenses de l'organisme, débouche sur un excès de masse grasse et sur le développement de l'obésité (Walrand *et al*, 2010). Les deux mécanismes les plus importants à l'origine de ces anomalies lipidiques associées à l'obésité androïde sont l'insulinorésistance et l'excès du flux des AGL. Le flux accru des AGL vers le foie augmente la sécrétion des lipoprotéines riches en TG, réduit la dégradation hépatique de l'apolipoprotéine B (apo B) et parallèlement induit une insulinorésistance hépatique et une augmentation de la production hépatique de glucose, servant de substrats pour une augmentation de la production des VLDL enrichies en apoprotéine E, conduisant à un déséquilibre lipidique (Farnier, 2007).

II.5 Traitement de l'hyperlipidémie

II.5.1 Substances synthétiques

II.5.1 Les statines

Les statines inhibent de manière compétitive l'HMG-coenzyme A réductase, qui participe à l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol dans le foie. De plus, les statines augmentent les niveaux de HDL, ce qui a des effets protecteurs cardiovasculaires et réduisent la sensibilité des lipoprotéines à l'oxydation, tant *in vitro* qu'*ex vivo* (Jain *et al*, 2007).

II.5.3 Fibrates ou stimulants de lipoprotéines lipases

Les fibrates affectent le métabolisme des lipides en tant qu'agonistes de l'enzyme récepteur alpha activé par le proliférateur de peroxydome (PPARa). Il en résulte une lipolyse périphérique des triglycérides riches lipoprotéines, une réduction de l'apoprotéine C-III, une augmentation de la production d'apoprotéine A-I, ainsi qu'une augmentation du C-HDL par la stimulation par PPARa de l'expression de l'apo A-I et de l'apo A-II (Jain *et al*, 2007).

II.5.4 La niacine

La niacine 19 est une vitamine hydrosoluble de type B, utilisée pour traiter la dyslipidémie. La niacine inhibe la lipolyse des triglycérides par la lipase sensible aux hormones, ce qui réduit le transport des acides gras libres vers le foie et diminue la synthèse des triglycérides hépatiques. Il en résulte une réduction de la production de VLDL hépatique et explique les taux réduits de LDL. La niacine augmente les niveaux de C-HDL en diminuant la clairance fractionnelle de l'apo A-1 dans les HDL (Jain *et al*, 2007).

II.5.2 Substances naturelles

Les modalités de prise en charge des dyslipidémies incluent les règles hygiéno-diététiques en première intention puis son association avec les traitements médicamenteux en cas d'échec d'atteinte d'objectifs thérapeutiques. Cependant la consommation des médicaments hypolipémiants et notamment les statines est devenue une préoccupation majeure. D'une part, pour leur coût exorbitant, d'autre part, la survenue depuis 2007 d'une polémique concernant l'efficacité et l'innocuité des statines, remettant en question les indications de leur prescription. Afin de prévenir les effets secondaires de ces médicaments, plusieurs études épidémiologiques suggèrent une contribution de certaines substances

Synthèse bibliographique

naturelles aux effets bénéfiques sur les facteurs impliqués dans le syndrome métabolique et les complications qui leur sont associées. Parmi ces substances végétales on cite :

II.5.2.1. Les polyphénols

Des études épidémiologiques ont établi une corrélation entre la consommation de polyphénols végétaux et une faible incidence de maladies coronariennes, probablement par leurs capacités à modifier de nombreux facteurs à l'origine de ces maladies. Certains polyphénols et notamment ceux du vin rouge possèdent des propriétés anti-oxydantes et captatrices de radicaux libres. Ils protègent les « lipoprotéines de faibles densités » contre l'oxydation. Par ailleurs, les polyphénols diminuent l'agrégation des plaquettes et sont capables d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Au niveau de l'endothélium vasculaire, les polyphénols stimulent la production de facteurs relaxants comme le monoxyde d'azote. Enfin, ils contribuent à préserver l'intégrité de l'endothélium vasculaire en agissant à la fois sur la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules endothéliales. Grâce à ces propriétés, les polyphénols pourraient interférer avec le processus athérogène et/ou les phénomènes thrombotiques associés à l'athérosclérose et pourraient expliquer les effets vasculo- et cardio-protecteurs de ces composés (**Martin, 2002**).

II.5.2.2. Les phytostérols

Les phytostérols sont les stérols végétaux, contenus en particulier, mais pas seulement, dans les fruits oléagineux. Leur structure est proche du cholestérol, exclusivement d'origine animale. Les phytostanols sont produits par hydrogénation des phytostérols. Ces composés rentrent en compétition avec le cholestérol au niveau de l'intestin et réduisent ainsi son absorption. La résultante de cet effet est une diminution du LDL-cholestérol (LDLC) (**Killner et al, 1951**).

II.3.2.3. Les oméga-3

Les plantes produisent naturellement des acides gras oméga 3 en particulier de l'acide α -linoléique. On le retrouve accumulé dans les triglycérides des graines oléagineuses (**Gontier et al, 2004**). L'effet anti-TG des acides gras oméga-3 est bien établi et pourrait être lié à une augmentation du débit de glucose hépatique. Une augmentation du récepteur α activé par les proliférateurs de peroxyosomes, entraîne une absorption hépatique accrue et une oxydation des acides gras libres, ainsi qu'une oxydation accrue des acides gras dans le muscle squelettique. La diminution consécutive de la disponibilité en acides gras libres entraînerait

Synthèse bibliographique

une diminution de la synthèse de TG et de l'Apo B-100 qui est un indicateur de la diminution du nombre de particules de LDL et de VLDL, Ceci est associé à une diminution du risque de maladie coronarienne et à la prévention du passage de l'athérosclérose à l'athérombose (Shidfar *et al*, 2008).

D'autant plus, les acides gras oméga-3 régulent positivement l'expression génique d'enzymes antioxydantes et régulent négativement les gènes associés à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Shidfar *et al*, 2008).

Matériel et méthode

Matériels et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Cette étude est réalisée sur les graines mures de *Pinus pinea* L, procurées du marché local de la ville de Blida. Les graines locales proviennent de la population des hauteurs de Chéra.



Figure 09 : graines de *Pinus pinea* L (originale).

I.2. Matériel animal et conditions d'élevage

Les expériences ont été menées sur une seule espèce animale. Il s'agit des rats mâles de souche *Wistar albinos*, obtenues à partir du CRD (Centre de Recherche et Développement) de SAIDAL à Alger, âgés d'au moins 90 jours et pesant entre 100 et 150 grammes.

Les animaux ont été identifiés, et placés dans des cages transparentes en polypropylène, à une température ambiante de 20 à 24 °C et d'humidité relative de 50%, avec un cycle de 10/14 h (lumière/obscurité), et disposés de granules d'aliment standard et eau de robinet, la litière utilisée est la sciure renouvelée 3 fois par semaine pour garder le bon conditionnement hygiénique des animaux (**annexe 01**).

II. Méthodes

II.1. préparation du matériel végétal

Les graines fraîches de *P. pinea* L ont été séchées à l'air libre, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre. La poudre obtenue est conservée dans un récipient en verre et stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à extraction.

Matériels et méthodes

II.1.1 Extraction des composés phénoliques

II.1.1.1. Délipidation de la poudre

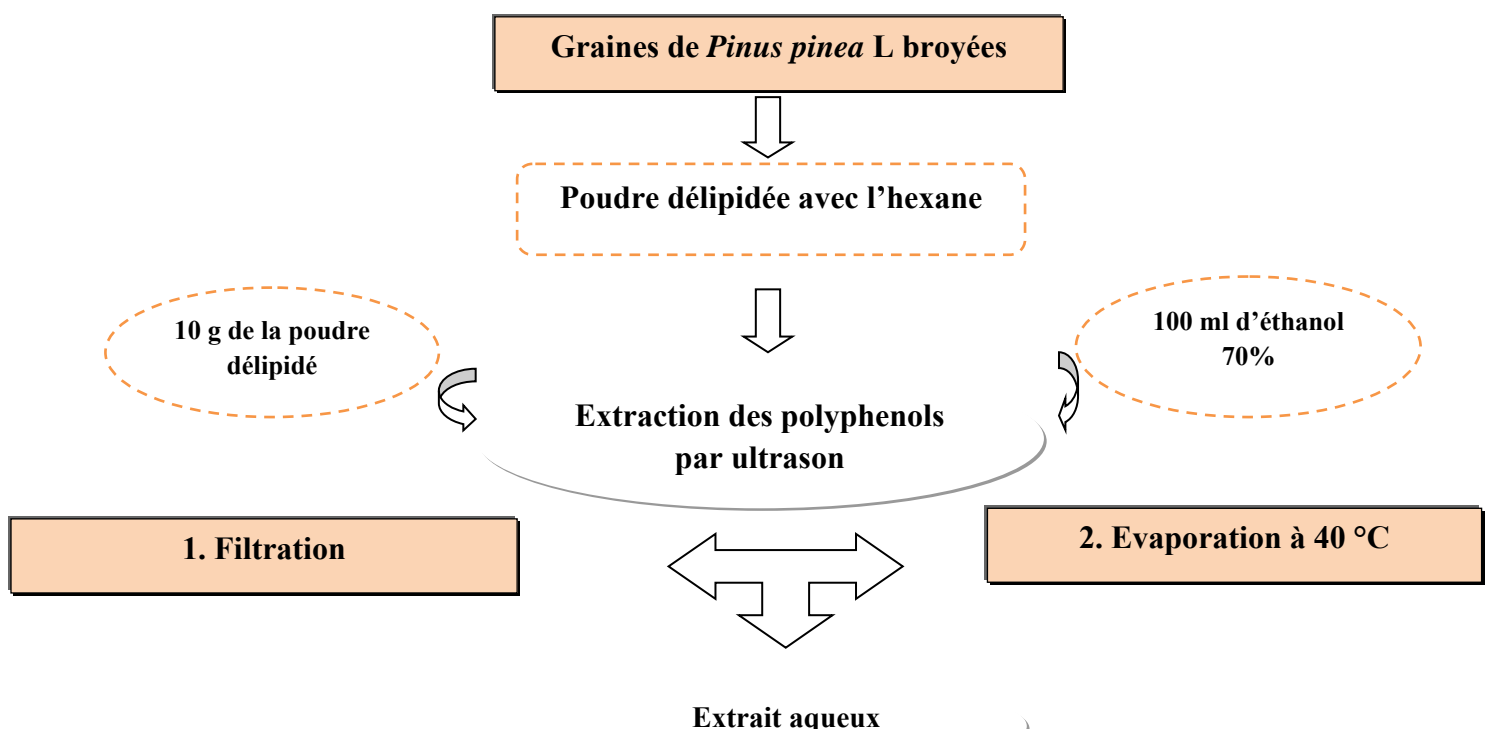
La délipidation des graines de *P. pinea L* a été réalisé en suivant le protocole de **Salma Cheikh-Rouhou *et al.* (2008)** en y ajoutant quelques modifications.

Cinquante grammes de graines de *Pinus pinea L* ont été placé dans un Becher et homogénéisé avec 250 ml d'hexane. Les graines ont été soumis a une macération par l'hexane pendant 4h sous agitation. Le surnageant a ensuite été filtré sur un papier filtre (Whattman). La procédure d'extraction a été répétée 3 fois. La poudre délipidé a été récupérée et conservé pour une extraction ultérieure.

II.1.1.2 Extraction des polyphenols

L'extraction par ultrasons des composés phénoliques provenant des graines de *Pinus pinea L* a été réalisée suivant le protocole préconisé par **Severina Pacifico *et al.* (2018)** avec certaines modifications.

Une macération accélérée par ultrason a été réalisé, en utilisant le l'éthanol comme solvant d'extraction. 10g de la poudre délipidé a été introduite dans 100 ml d'éthanol 70%, en effectuant 3 cycles de sonication (30min). A la fin des cycles, l'échantillon a été filtré sur papier wattman. L'extrait a été combiné et concentré dans un évaporateur rotatif jusqu'à l'élimination complète de l'éthanol. Ensuite, l'extrait a été lyophilisé (24 heures) et conservé dans des flacons ambrés hermétiques à -25 ° C.



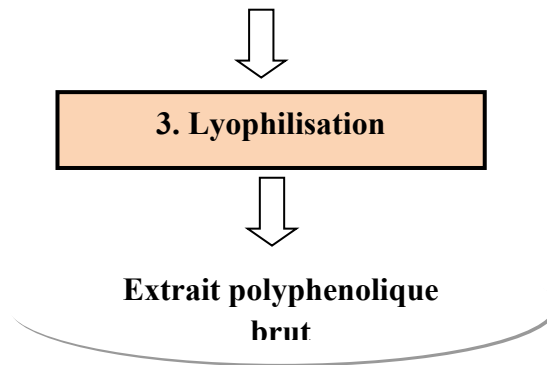


Figure 10: Etapes d'extraction des composés phénoliques des graines de *Pinus pinea* L (Severina Pacifico *et al*, 2018).

II.2. Analyse phytochimique

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

🚦 Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits obtenus (Boizot et Charpentier, 2006). Les polyphénols totaux des extraits ont été déterminés par utilisation de la méthode de Follin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme standard (Singleton et Rossi, 1965).

🚦 Mode opératoire

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

Le taux des polyphénols dans les extraits des graines de *P. pinea* L, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique comme standard de référence (Annexe 02). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme (mg EAG / g d'extrait) (Talbi *et al*, 2015).

$$C = c * v / m$$

Avec :

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

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

v = volume de l'extrait (ml).

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

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

III.2.2. Dosage des flavonoïdes

Principe

La méthode colorimétrique de dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl₃), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dans l'absorption maximale et la longueur d'onde à 415 nm, contre un témoin (**Djeridane et al, 2006**).

Mode opératoire

Un volume de 1 ml d'une solution éthanolique d'AlCl₃ (2%) a été ajouté à 1ml d'échantillon. Après 1 h d'incubation à la température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 420 nm (**Wu et al, 2009**). Une courbe d'étalonnage établie par la quercétine (**Annexe 03**), servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur totale en flavonoïdes des extraits de plantes a été exprimée en milligrammes équivalent de quercétine par gramme de poudre de plante (mg Eq Q/ g). L'expérience a été faite en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type

II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante

II.2.3.1. Mesure de L'activité anti-radicalaire (DPPH)

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux (**Bentabet et al, 2014**). Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques.

✚ Principe du test

Le DPPH possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. C'est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant vers la couleur jaune mesurable par spectrophotométrie à 514–518 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu) (**Bentabet *et al*, 2014**).

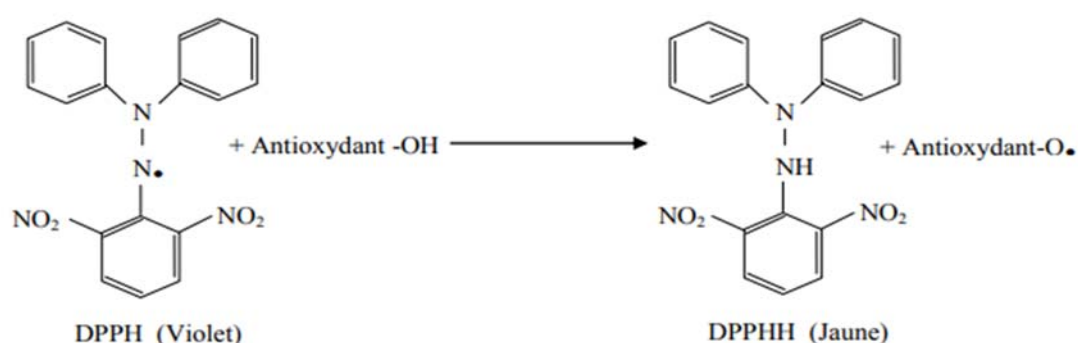


Figure 11: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (**Talbi *et al*, 2014**)

✚ Mode opératoire

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Bentabet *et al*. (2014)**. En y ajoutant certaines modifications.

Un volume de 100 μL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1250 μL de la solution éthanolique du DPPH (90 $\mu\text{mol/l}$) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 100 μL d'éthanol avec 1250 μL d'une solution éthanolique de DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante, la lecture des absorbances a été effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc pour chaque concentration. Le contrôle positif a été représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration.

Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon. Cette méthode est basée sur

Matériels et méthodes

la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. Le pourcentage d'inhibition (%I) du radical libre DPPH par l'extrait est déterminé selon formule suivante :

✚ Où :

$$\%I = [(A1 - A2)/A1] \times 100$$

A1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A2 : absorbance en présence d'extrait ou d'acide ascorbique.

L'activité anti radicalaire d'un extrait est généralement exprimée par la détermination de l'IC50, qui correspond à la concentration dont le pourcentage d'inhibition (%I) est de 50%, à partir de la courbe présentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon. Dans notre cas IC 50 est exprimée en mg du l'extrait /ml de milieu réactionnel.

II.2.3.2. Test ABTS⁺

✚ Principe

L'activité antioxydante de l'extrait polyphenolique a été évaluée par le test ABTS⁺, basé sur la capacité des antioxydants à interagir avec le radical ABTS⁺, diminuant son absorbance à 734 nm (**Boukhalfa *et al*, 2018**). Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium (K₂S₂O₈) pour former le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert (**Figure 13**). L'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical ABTS^{•+} en ABTS. L'activité antioxydante est déterminée par la décoloration de la solution et s'exprime par le pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm (**Sarr *et al*, 2015**).

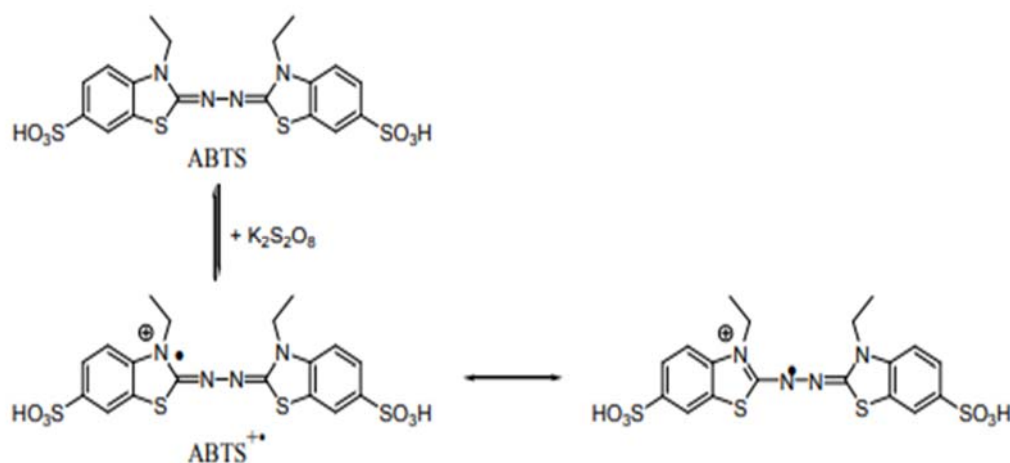


Figure 12 : Formation du radical cation $ABTS^{\bullet+}$ à partir de l'ABTS (Sarr *et al*, 2015).

Mode opératoire

La méthode utilisée a été celle décrite par **Leong et Shui. (2002)**. Le radical d' $ABTS^{\bullet+}$ a été préparé en mélangeant 50 mg d'ABTS et 9 mg de persulfate de potassium. Le mélange obtenu a été conservé à l'obscurité et à température ambiante pendant 16 h avant usage.

La solution d' $ABTS^{\bullet+}$ a été diluée avec de l'éthanol absolu jusqu'à une absorbance de 0,700 à 734 nm. L'activité antioxydante a été mesurée en additionnant 1500 μ L de la solution d' $ABTS^{\bullet+}$ à 50 μ L d'extrait. Les extraits ont été testés aux concentrations suivantes : 5 ; 10 ; 20 ; 30 et 40 mg/mL. L'acide ascorbique, utilisés comme antioxydants de référence, a été testé aux concentrations suivantes : 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 mg/ml. Après 6 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant l'éthanol absolu comme blanc. Le pourcentage d'inhibition (%I) et L'IC50 ont été exprimés comme précédemment décrits pour le test DPPH.

II.2.3.3. Réduction du Fer : FRAP

Principe

L'activité antioxydante des extraits éthanolique des graines de *Pinus pinea* L été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. Elle est basée sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} (**Kholkha *et al*, 2013**). La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**).

Mode opératoire

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode préconisée par **Gheffour *et al.* (2015)**. 800 µL de différentes concentrations de chaque extrait de 10 à 50 mg/mL ont été mélangés avec 2,5 mL de la solution tampon phosphate 0,2 M à pH 6,6 et 2,5 mL de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%. Les mélanges ont été incubés à 50°C pendant 30 minutes puis refroidis. Ensuite, 2,5 mL de l'acide trichloracétique (10%) ont été additionnés. 2,5 mL de chaque concentration ont été mélangés avec 0,4 mL de chlorure de fer ($FeCl_3$) à 0,1%. L'acide ascorbique a été utilisé comme antioxydant de référence dans cette expérience. La lecture des absorbances a été faite contre un blanc à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés et donc un pouvoir antioxydant élevé.

L'activité antioxydante liée au pouvoir réducteur (PR) a été exprimée à l'aide de la formule suivante :

$$\%PR = [(Ae - Ac)/Ae] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

Ae : absorbance en présence d'extrait ou d'acide ascorbique.

II.3. Etude de l'activité hypolipémiante

Principe

L'hyperlipidémie a été induite expérimentalement par le Triton X-100. Le TX-100 est un surfactant non ionique reconnu comme un bon émulsifiant pour les triacylglycérols, il est approprié pour la détermination de l'activité lipolytique. Il permet de produire une élévation des principaux composants lipidiques du sérum sanguin, en augmentant la synthèse hépatique du cholestérol et/ ou retardant leur dégradation (**Kellner *et al.*, 1950; Gundamaraju *et al.*, 2014**).

II.3.1. Matériel animal et induction de l'hyperlipidémie

Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée sur 25 rats *Wistar albinos* males pesant entre 150 à 200g. L'hyperlipidémie a été réalisée en suivant le Protocole de **Shukla et al. (2015)**. Elle a été induite par injection intra-péritonéale unique du Triton X-100 à une dose de 100 mg/kg du poids corporel dissoute dans une solution saline (0.9% solution NaCl), à des rats expérimentaux restés à jeun pendant une nuit. Après l'injection du Triton les rats développent une hyperlipidémie aiguë.

II.3.2. Protocole expérimental

Les rats ont été divisés en cinq groupes, chaque groupe étant constitué de cinq animaux. La conception expérimentale et le calendrier de traitement ont été suivis comme suit (**Shukla et al, 2015**) :

- ✚ Le groupe 1 (control normal) reçoit une injection intra-péritonéale d'une solution saline (eau physiologique), suivi d'un gavage avec de l'eau physiologique.
- ✚ Le groupe 2 (control hyperlipidémique) reçoit une injection intra-péritonéale du Triton X-100 à une dose de 100 mg/kg du poids corporel, suivi d'un gavage avec de l'eau physiologique.
- ✚ Les groupes 3 reçoit une injection intra-péritonéale du Triton X-100 à une dose de 100mg/kg du poids corporel, suivi d'un gavage avec de l'atorvastatine a une dose de 10 mg/kg.
- ✚ Les groupes 4 et 5 reçoivent une injection intra-péritonéale du Triton X-100 à une dose de 100mg/kg du poids corporel, suivi d'un gavage avec l'extrait polyphénolique des graines de *Pinus pinea L* à des doses respectives de 200 et 400 mg/kg du poids corporel.

II.3.3. Collecte du sang et d'organes

Après 7 jours de traitement, les animaux ont été anesthésiés avec de l'éther diéthylique et leur sang, leurs foie et leurs cœurs ont été recueillis. Les échantillons de sang ont été immédiatement centrifugés (2000 tr / min pendant 15 min) et le plasma a été utilisé pour le dosage des paramètres lipidique en utilisant différents kits biochimiques (Biolabs / Span Kits). Les foies collectés ont été conservés pour l'étude histopathologique.



Figure 13: (A) injection du triton ; (B) gavage ; (C) récolte du sang par sinus retro orbitaire (originale).

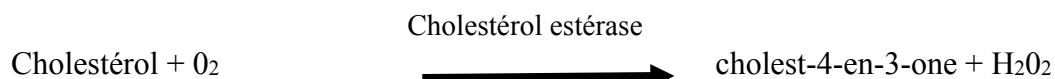
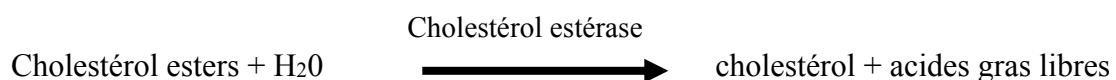
II.3.4. Dosage des paramètres lipidiques sanguin

Après séparation du sérum et du sang, les divers paramètres du profil lipidique ont été estimés, notamment le Cholestérol (TC), triglycérides (TG), lipoprotéines de basse densité (LDL) et lipoprotéines de haute densité (HDL). Les valeurs normales du bilan lipidique sans facteur de risque sont rassemblées dans le tableau ci-dessus (**Berthélémy, 2014**) :

II.3.4.1. Dosage du cholestérol total

🚦 Principe

Le cholestérol plasmatique est libéré par le cholestérol estérase à partir des esters de cholestérols puis oxydés par le cholestérol oxydase en cholestenona, parallèlement à la libération des molécules H₂O₂. L'intensité de la couleur formé, est proportionnelle à la concentration de cholestérol dans l'échantillon (**Pesce et Bodourian, 1976**).



Matériels et méthodes

Mode opératoire

Après préparation de solutions de blanc et de standard. Le tout est mélangé et incubé pendant 05min à 37°C, les absorbances sont lues à 505nm et la couleur est stable pendant au moins 60 minutes [spinreact].

	Blanc	Standard	Echantillon
Blanc (ml)	1.0	1.0	1.0
Standard (μL)	---	10	---
Echantillon (μL)	---	---	10

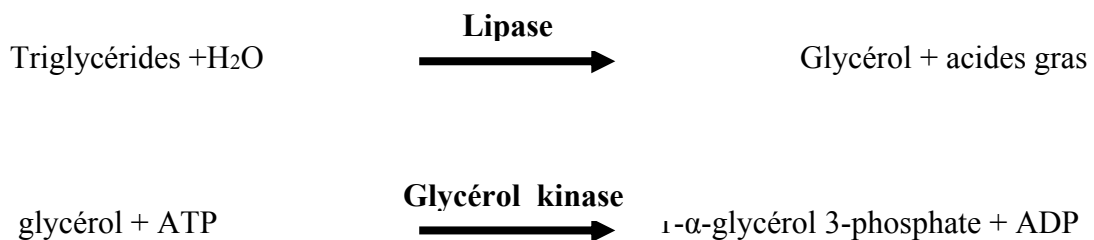
Le taux du cholestérol total est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{(A) \text{ échantillon} - (A) \text{ Blanc}}{(A) \text{ standard} - (A) \text{ Blanc}} \times 200 = \text{mg/dL}$$

Facteur de conversion : = mg/dL \times 0.0258 = mmol/L

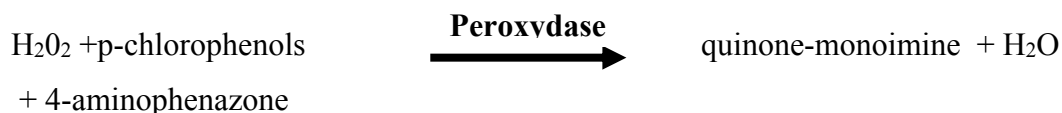
II.3.4.2. Dosage des triglycérides

Les triglycérides de l'échantillon sont incubés avec les lipoprotéine lipases (LPL), qui libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine-5-phosphate (ADP) par le glycérol kinase en présence d'ATP. Le glycérol-3-phosphate est convertie par la suite par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) réagit avec le 4-aminophénazone (4-AP) et le p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD), ce qui donne une couleur rougeâtre (Fossati, et Prencipe, 1982).



Matériels et méthodes

1- α -glycérol phosphate oxydase



Mode opératoire

Le dosage des triglycérides nécessite la réalisation de la solution de blanc et de standard, dont le mode opératoire est illustré dans le tableau ci dessus. Après mélange, les tubes sont incubés à 37°C, pendant 5minutes. Les mesures de la densité optique (DO) sont effectuées au spectrophotomètre à 505 nm (490-550) [spinreact].

	Blanc	Standard	Echantillon
RT (ml)	1.0	1.0	1.0
Standard (μ l)	---	10	---
Echantillon (μ l)	---	---	10

Le taux des triglycérides est exprimé en g/L ou en mmol/L selon la formule suivante :

$$\frac{(\text{A}) \text{ échantillon} - (\text{A}) \text{ Blanc}}{(\text{A}) \text{ standards} - (\text{A}) \text{ Blanc}} \times 200 = \text{mg/dL}$$

$$(\text{A}) \text{ standards} - (\text{A}) \text{ Blanc}$$

$$\text{Facteur de conversion} : = \text{mg/dL} \times 0.0258 = \text{mmol/L}$$

II.3.4.4. Dosage de HDL

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) présentes dans l'échantillon, se précipitent par le phosphotungstate en présence d'ions magnésium. Après centrifugation et élimination du culot, le surnageant contenant les lipoprotéines de haute densité (HDL) est utilisé pour doser les HDL-cholestérol en employant le réactif de l'enzyme cholestérol total [Spinreact].

Matériels et méthodes

✚ Mode opératoire

Après l'ajout du réactif, le mélange est homogénéisé et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite le tout est centrifugé à 4000 tour/minute pendant 20 minutes. Le surnageant contenant le HDL-c est récupéré et utilisé pour doser le taux du HDL par la même méthode du cholestérol total [Spinreact].

RT (réactif de travail)	100 µl
Echantillon	1.0 ml

La mesure des absorbances est effectuée au spectrophotomètre à 505 nm. La concentration du HDL cholestérol est calculée selon la fonction suivante :

$$A_{505nm} \text{ Echantillon} \times 320 = \text{mg/dl HDL-c dans l'échantillon.}$$

II.4. Etude histopathologique

II.4.1. Prélèvement d'organe

Après la collecte du sang, les cadavres des rats sacrifiés après anesthésie et sont fixés sur une plaque en liège sur leur partie dorsale en fixant ses quatre pattes à l'aide de punaises de fixation. Suite à ça, on procède à la dissection de la cavité abdominale. Le foie et le cœur ont été isolés pour observer les changements histopathologique ou les anomalies tissulaires (lésions, couleur, consistance...etc.) Le prélèvement des organes est effectué délicatement sur le foie et le cœur, afin de ne pas meurtrir les tissus. Une fois obtenu, les organes sont immédiatement immergés dans un grand volume de liquide fixateur (le formol).



Figure 14: dissection des rats et récolte d'organes (originale)

Matériels et méthodes

II.4.2. Fixation

La fixation consiste à figer les structures des organites cellulaires et garder les constituants cellulaires dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. Le principe se base sur la dénaturation irréversible des protéines. Il s'agit d'une action brutale avec des altérations des protéines globulaires qui s'agencent pour former une trame fibreuse.

Les organes sont lavés immédiatement avec une solution d'eau physiologique et immergé dans une solution de formol pour éviter l'effritement des tissus. Apes avoir coupé les organes en petits morceaux, ils sont mis dans des cassettes spéciales (**annexe05**).

II.4.3. Lavage déshydratation et éclaircissement

Les pièces fixées sont ensuite placées dans l'automate, celui-ci est réglé sur un cycle de 22 heures, on distingue trois étapes successives : déshydratation, désalcoolisation et éclaircissement. Les cassettes contenant les organes prélevés, sont baignées successivement dans 7 bacs d'alcool (éthanol à 70° et à 100°) pour réaliser une déshydratation. Ensuite ces prélèvements sont plongés dans 3 bacs de xylène qui est un excellent agent désalcoolisant et d'éclaircissant. Cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe (**annexe 06**).

II.4.4. Imprégnation, enrobage à la paraffine (inclusion) et confection des bloque

L'imprégnation signifie le passage du prélèvement dans un liquide intermédiaire afin d'en éliminer les traces d'alcool (la paraffine étant non miscible à l'alcool). Elle consiste laissé les cassettes dans les deux bains de paraffine-xylène dans l'automate pendant 3heurs, et les émergé dans deux bains a chaud et successifs de paraffine pure pendant 2 heures chacun dans le distributeur de paraffine (**annexe 07**).

L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine. Elle consiste à placer les morceaux d'organes dans un bloc métallique remplis de paraffine fondue (chauffée à 56° C) donc devenue liquide. Le prélèvement baigne dans de la paraffine qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement on se trouve alors en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

Matériels et méthodes

II.4.5. Confection des coupes histologiques

Cette étape se fonde sur le passage du bloc de paraffine dans un microtome qui permet de réaliser des tranches de section de 2 à 5 μm disposées en série régulières sous forme de rubans (**annexe 08**). La confection des coupes histologiques comporte alors 3 étapes :

- L'étalement : de segments de rubans de paraffine sur une lame de verre contenant un liquide d'étalement tel que l'eau albumineuse (gélifiante)
- Le collage : les lames de verre sont placées sur une plaque chauffante, réglée à une température de 40°C, pendant 15 min.
- Le séchage de la préparation : en inclinant les lames et en les séchant au moyen de papier buvard.

II.4.6. Déparaffinage des coupes

L'inclusion de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire pour réaliser les coupes) implique son élimination préalablement à la coloration. En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans du xylène puis dans des alcools de titre décroissant, de 100 % (compatible avec le xylène) jusqu'à 70 % (compatible avec l'eau), avant un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale.

II.4.7. Coloration

Le but de la coloration est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires. La coloration des coupes cellulaires a été réalisée par une technique de coloration d'usage courant en histologie et en histopathologie. C'est une coloration bichromatique qui se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline (violet/noir), et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine (rouge) (**annexe 09**).

Cette étape consiste à immerger les lames dans un bain d'hémalum pendant 3 minutes suivis d'un rinçage à l'eau courante pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite mises dans l'éosine pendant 30 seconde puis rincés immédiatement à l'eau courante. Se suit une déshydratation à l'alcool à des concentrations croissantes pendant 2 minutes. En fin la coloration s'achève avec un bain de xylène qui prend de 2 à 3 minutes.

II.4.8. Montage et observation microscopique

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique. L'observation microscopique est réalisée au G×40, en révélant le noyau en violet et le cytoplasme en rose.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

I. Le rendement d'extraction

Le rendement en polyphénols des graines de *Pinus pinea* L extraits par sonication, en utilisant l'éthanol comme solvant a été exprimé en pourcentage massique par rapport à la matière sèche. Ce dernier est représenté au niveau du tableau ci-dessous. Le poids de l'extrait sec a été déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

Tableau V : Poids d'extrait sec et rendement correspondant de l'extrait polyphénolique à partir des graines de *Pinus pinea* L.

Extrait	Poids d'extrait sec (g)	Rendement %
Polyphénolique	0.902	4.5%

Il ressort de cette étude que l'extrait obtenu correspond à un rendement de 4,5%. Ce rendement est différent à celui obtenu par **Kadri et al. (2015)**. Cette différence est peut-être due à la nature du solvant utilisé qui est le méthanol, car le taux d'extraction des composés phénoliques à partir d'une matière végétale peut être influencé par leur nature chimique, la nature du solvant, la méthode d'extraction utilisée (macération), le diamètre des particules de l'échantillon et le temps de macération.

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale (**Do et al, 2013**). Les facteurs importants affectant la stabilité des polyphénols sont le pH, l'oxygène, la température, la lumière, l'association intermoléculaire et intramoléculaire avec d'autres composés et ions métalliques (**Abid et al, 2014**)

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

Résultats et discussion

Selon **Abid et al. (2014)**, l'extraction des polyphénols par sonication améliore considérablement les teneurs en ces derniers, ce qui n'était pas le cas dans la présente étude. Par conséquent, d'autres études devraient être menées pour optimiser les conditions telles que la durée, la température, la fréquence et l'amplitude du traitement de sonication.

II. Le taux en polyphénols totaux et flavonoïdes

La détermination des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes dans les deux extraits de graines de *Pinus pinea* L a été réalisée en utilisant séparément les méthodes colorimétriques (Folin-Ciocalteux et trichlorure d'aluminium (AlCl₃)).

La teneur en phénols totaux a été rapportée en mg équivalent d'acide gallique/g du matériel végétal sec à partir de l'équation ($y=0,0049x+0,0508$) (**annexe 02**). La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium a été rapportée en mg équivalent de quercétine/g du matériel végétal sec à partir de l'équation ($y=0,0123x + 0,1242$) (**annexe 03**). Les résultats de la teneur en phénols totaux et flavonoïdes sont illustrés dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/ gE) et en flavonoïdes (mg EQ/ gE) de l'extrait polyphénolique.

Extrait	Polyphénols totaux mg EAG/ g E	Flavonoïdes mg EQ/ g E
Ethanolique	8,9 ± 0,312	0,785 ± 0,10

Les résultats montrent que l'extrait éthanolique du *Pinus pinea* L possède une teneur plus élevée en polyphénols totaux qui est de l'ordre de 8,9 ± 0,312 mg EAG/ g E. La teneur en flavonoïdes enregistrée quant à elle est égale à 0,785 ± 0,10 mg EQ/ g d'extrait sec. A partir de ces données, on peut déduire que les polyphénols représentent la fraction majoritaire par rapport aux flavonoïdes dans l'extrait éthanolique.

Selon l'étude menée par **Kadri et al. (2014)**, faite sur les graines de *Pinus pinea* L, les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes trouvées dans l'extrait éthanolique sont de 7,99 ± 0,211 mg EAG/ g E et 2,17 ± 0,118 EQ/ g E respectivement. Ces valeurs sont différentes de celles obtenues avec cette étude. Ceci peut être expliqué par la méthode d'extraction utilisée

Résultats et discussion

par **Kadri *et al.* (2014)**, qui est la macération, ainsi que la pureté du solvant (10 ml de méthanol : eau V/V).

Le fait que le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, la nature de la graine (noyaux avec ou sans coquille), le climat, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante, la température et le solvant d'extraction utilisé (**Conde *et al.*, 2009**).

III. Evaluation de l'activité antioxydante

La présente étude s'est proposé de réaliser la quantification de composés polyphénoliques et l'évaluation par spectrophotométrie de l'activité antioxydante des graines de *Pinus pinea* L. L'activité antioxydante in vitro a été évaluée de trois manières différentes : le test au DPPH, la technique de décoloration du radical cation ABTS et la mesure du pouvoir réducteur.

III.1 Le test de piégeage du radical DPPH

Le DPPH est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse. Les résultats de la capacité scavenger de radical DPPH[•] des polyphénols des graines de *P.pinea* L ainsi que des standards utilisés sont illustrés sur la **figure 15**.

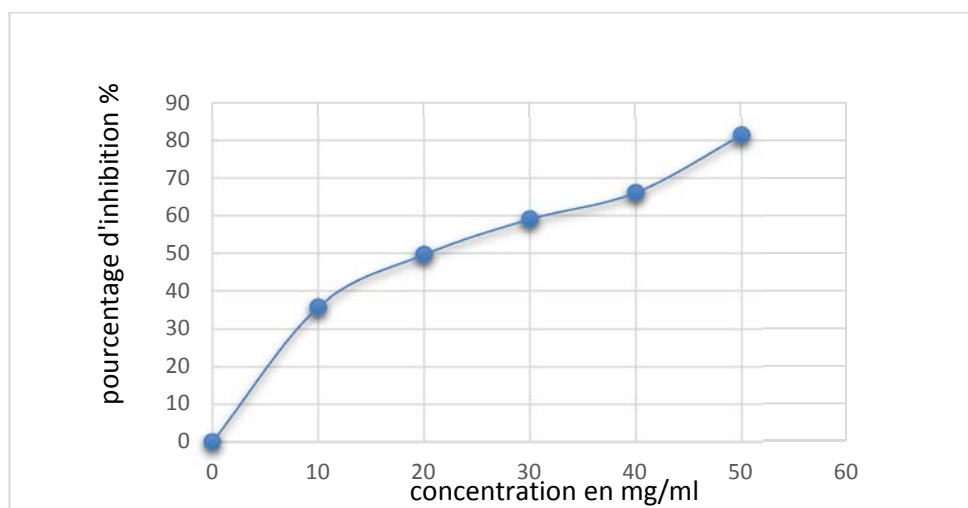


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait polyphénolique.

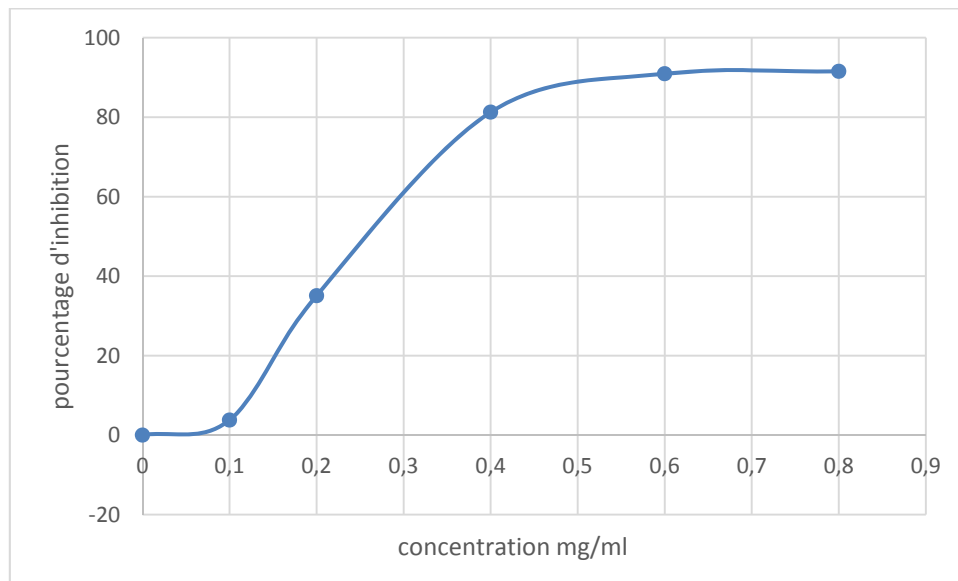


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.

D'après les résultats représentés dans les **figures (16, 15)**, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente proportionnellement avec la concentration que ce soit pour le standard (l'acide ascorbique) ou pour l'extrait polyphenolique de la plante.

Pour une concentration de 0,8 mg/ml, le standard (acide ascorbique) a révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de 98,17%. Concernant l'extrait, pour une concentration de 50 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de DPPH est de 91,13 % pour l'extrait éthanolique. Ces pourcentages correspondent à une inhibition presque totale du DPPH reflétée par la décoloration complète du DPPH du violet en jaune pâle.

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

Nous avons déterminé pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH ou IC50. À partir des équations des régressions linéaires des graphes. Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant :

Résultats et discussion

Tableau VII : Résultat du test antioxydant exprimant la concentration efficace 50% en mg/ml pour le DPPH.

	IC50 Moy \pm Et (mg/ml)
Extrait éthanolique	20 mg/ml
Acide ascorbique	0,25 mg/ml

D'après les résultats présentés dans le **tableau VII**, l'IC50 obtenu pour l'acide ascorbique (0,25 mg/ml) utilisé comme une molécule de référence, est bien plus inférieur à celui de l'extrait et donc, une activité antioxydante très élevée.

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**), d'autant plus, les polyphénols contenus dans notre extrait est probablement responsable de l'activité antioxydante. Il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé du groupement hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (**Heim et al, 2002**) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (**Torres De Pinedo et al, 2007**), ce qui peut expliquer en partie que l'activité anti-radicalaire soit dépendante du nombre, de la position et le degré de polymérisation (**Popovici et al, 2009**). Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (**De Quirós et al, 2010**).

III.2 test ABTS

L'activité antioxydante de l'extrait de *Pinus pinea* L a été déterminée aussi par la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant capacity), cette activité est déduite par la capacité des molécules à inhiber le radical ABTS⁺. Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ par l'extrait éthanolique de *Pinus pinea* L est représenté dans **la figure 17**.

Résultats et discussion

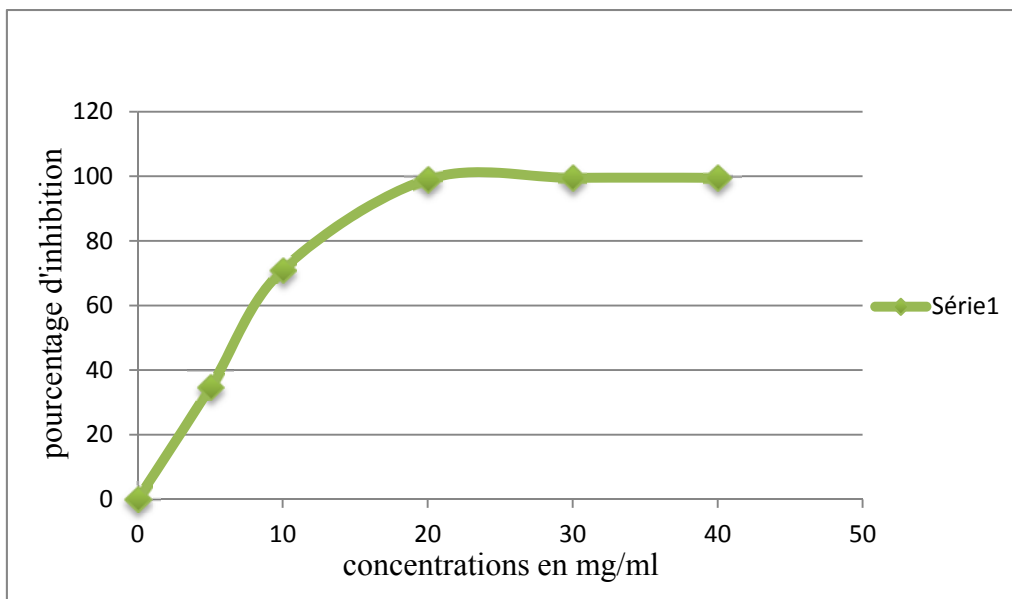


Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du $ABTS^+$ en fonction de différentes concentrations de l'extrait polyphénolique.

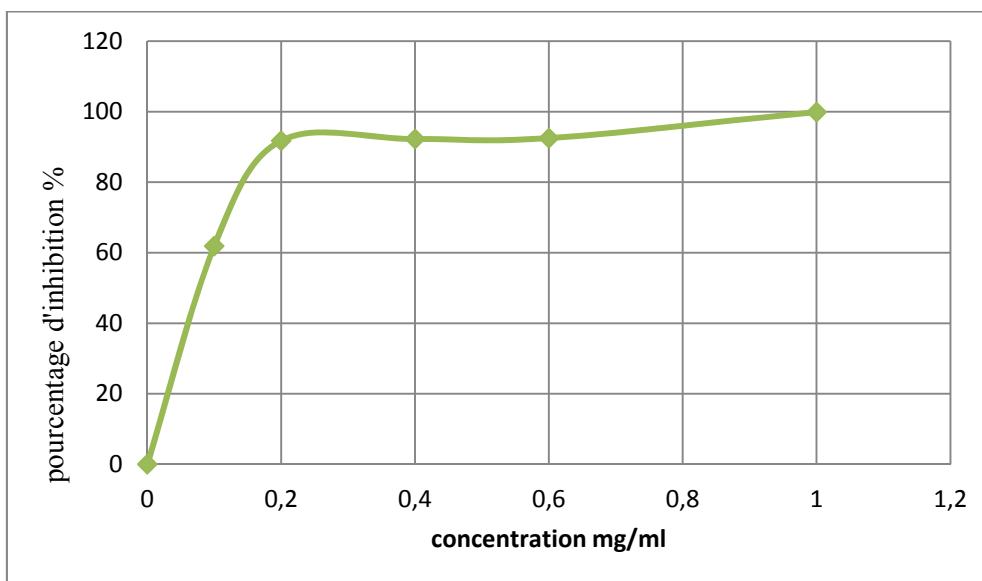


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition de l' $ABTS^+$ en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.

D'après cette figure, on remarque que le taux d'inhibition marqué par de l'acide ascorbique augmente en fonction de l'augmentation de la concentration, ce qui est tout à fait le cas avec l'extrait polyphénolique. A 10 mg/ml, il est de l'ordre de 75% et augmente jusqu'à atteindre 98,38% à 20 mg/ml. Cette augmentation devient presque stable à des concentrations

Résultats et discussion

supérieures à 20 mg/ml et atteint 100% à 40 mg/ml, ce qui signifie que toutes les molécules ABTS⁺ sont réduites en ABTS.

Les valeurs IC₅₀ déterminées en mg/ml exprimant la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de moles de ABTS⁺ en dissolution dans de l'éthanol (**Tableau VIII**).

Tableau VIII : Résultat du test antioxydant exprimant la concentration efficace 50% en mg/ml pour l'ABTS.

	IC ₅₀ Moy ± Et (mg/ml)
Extrait éthanolique	7 mg/ml
Acide ascorbique	0,1 mg/ml

La valeur de l'IC₅₀ calculé pour l'extrait de *Pinus pinea* L est de l'ordre de 10.064 mg/ml, valeur supérieur a celle de la molécule de référence (acide ascorbique), ce qui confirme que l'extrait polyphenolique exhibe une activité antioxydante remarquable.

III.3 test FRAP

L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *Pinus pinea* L a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide, reproductible et universel. C'est une méthode de mesure de la puissance des substances de nos extraits à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺ qui est l'un des mécanismes antioxydants (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**). Les résultats du pouvoir réducteur sont représentés sur la **figure 19**.

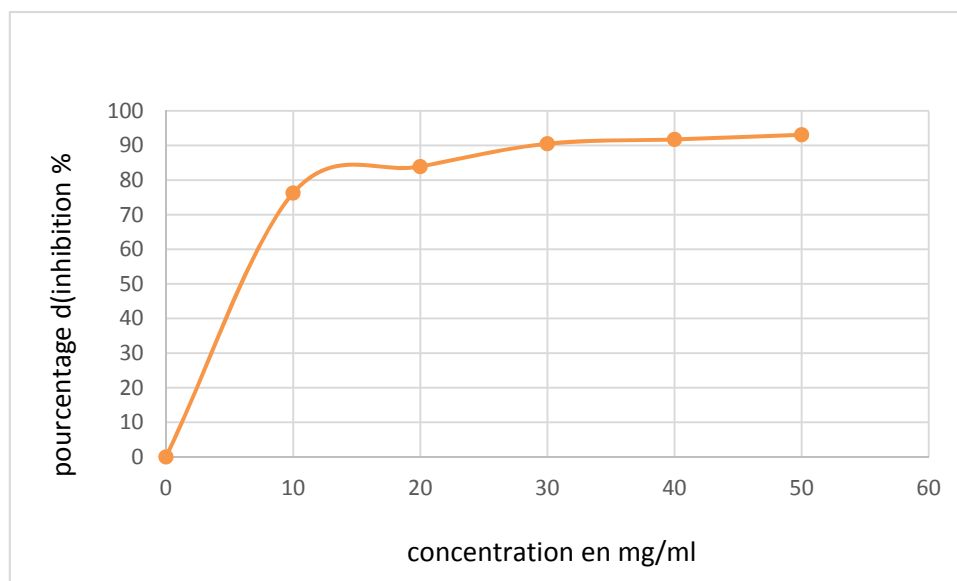


Figure 19 : Pourcentage de réduction du fer ferrique en fonction de différentes concentrations de l'extrait polyphénolique.

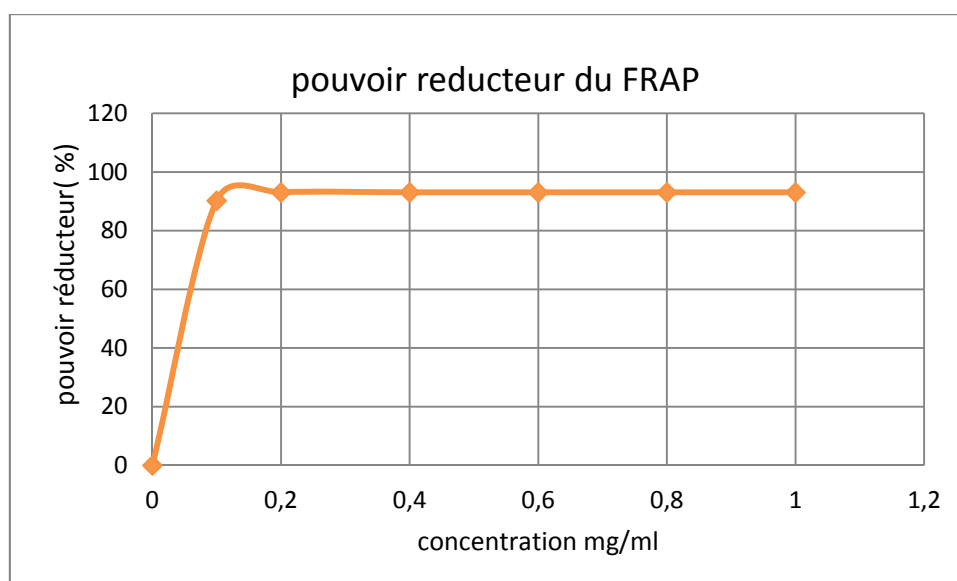


Figure 20 : Pourcentage de réduction du fer en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.

Dans notre travail, nous avons testé, par la méthode de FRAP, l'extrait polyphénolique des graines de *Pinus pinea* L, et les résultats obtenus nous ont permis de tracer une courbe du pourcentage de réduction en fonction des différentes concentrations.

Résultats et discussion

D'après ces résultats, nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons. Notre extrait présente une activité antioxydante nettement inférieure que celle de la référence (acide ascorbique). Pour ce dernier la réduction est presque stable à partir d'une concentration de 0,2 mg/ml.

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dose dépendante (concentration dépendante). A la concentration de 50 mg/ml, le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de *Pinus pinea* L est largement supérieur (93,1%). Le pouvoir réducteur de l'espèce est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**).

IV. Etude de l'effet hypolipidémiant

IV.1 Dosage des paramètres lipidiques sanguins

Les paramètres lipidiques sanguins ont été déterminés après 24h qui suivent le traitement. Les résultats ont été exprimés en moyenne de cinq dosages \pm l'écart-type. Les résultats sont montrés dans le tableau (**annexe 10**).

Après traitement avec différentes doses de l'extrait polyphénolique (200 et 400 mg/kg), le phénomène inverse se produit, c'est-à-dire une diminution des paramètres lipidiques des lots III(traité par l'atorvastatine), IV et V (traité par l'extrait) en comparaison avec le lot II (contrôle hyperlipidémique). Cette diminution est soit très hautement significative ($p < 0,001$), soit significative ($p < 0,05$).

Le niveau de cholestérol total dans le sang est un indicateur essentiel d'une hyperlipidémie. Après l'administration par voie intra péritonéale du TX-100 à une dose de 100 mg/kg aux lots II-V, les résultats obtenus sont montrés dans **la figure 21**.

Le traitement avec Triton X-100 a causé une élévation triplée au niveau du cholestérol total du lot II comparé au lot I. Le Triton X-100 agit en tant qu'un agent tensioactif et supprime l'action des lipases pour bloquer la prise des lipoprotéines de la circulation par le tissu extra hépatique ayant pour résultat l'augmentation de la concentration des lipides sanguins (**Aarati et al, 2015**).

Résultats et discussion

Le taux du cholestérol total a diminué d'un taux de 36,95% avec la première dose (200 mg/kg) et de 45% avec la deuxième dose (400 mg/kg) par rapport au lot hyperlipidémique. Cependant, l'atorvastatine (10 mg/kg) a enregistré le meilleur pourcentage de réduction du cholestérol total atteignant 54,3 % de réduction.

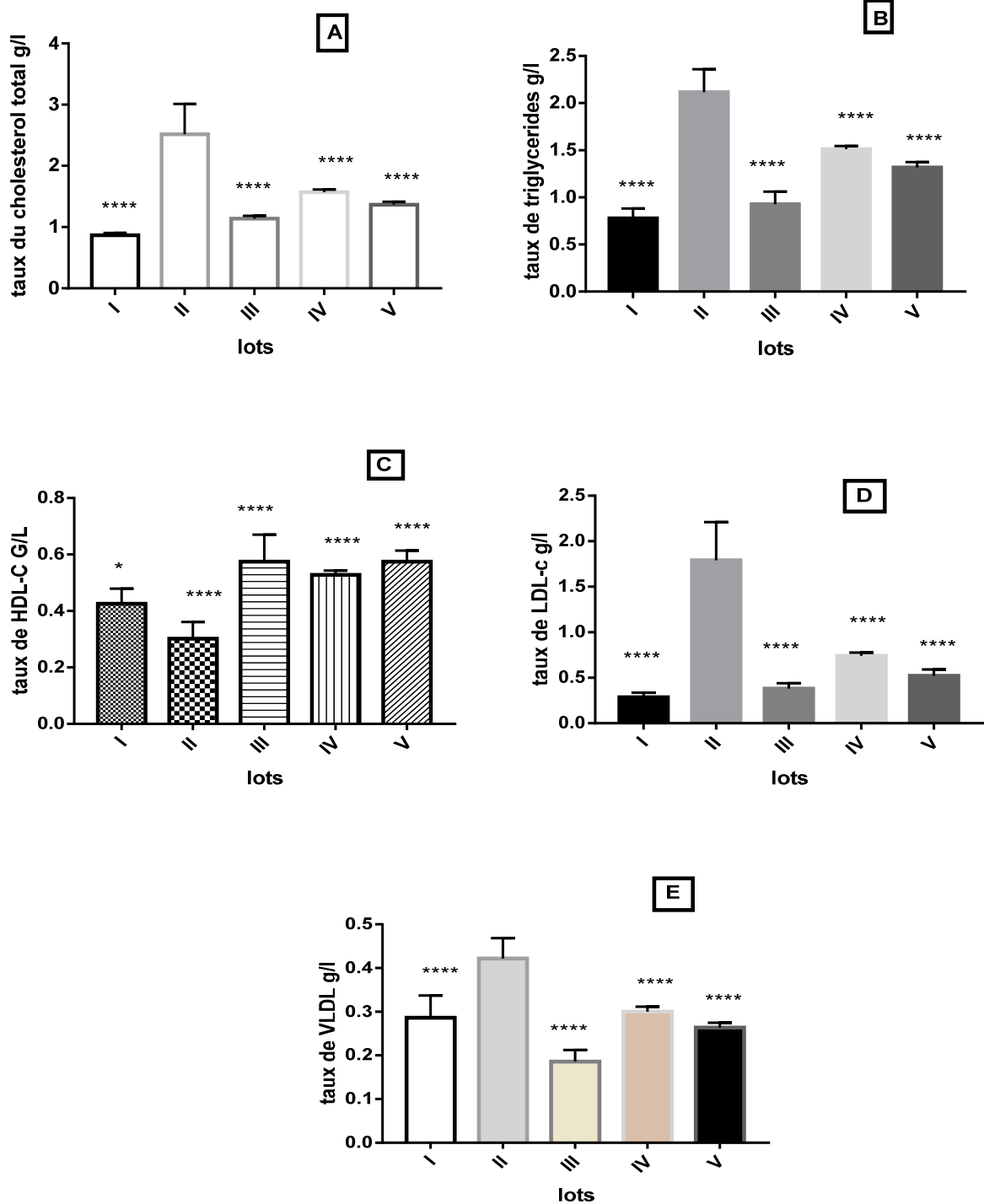
Les triglycérides représentent la forme de stockage des acides gras dans l'organisme (**Lagroste *et al*, 2004**). Les triglycérides sont intégrés dans les lipoprotéines pour assurer leur transport dans les milieux aqueux, les lipoprotéines riches en triglycérides sont les VLDL et les chylomicrons. D'après les résultats, les triglycérides ont diminué d'une façon très significative, avec 44,07 % de réduction avec l'atorvastatine (10 mg/kg), atteignant presque de 37,45% de diminution avec la dose 400 mg/kg, mais seulement 28,44 % à la dose de 200 mg/kg du poids corporel. Cette diminution significative du niveau TG peut être due à l'augmentation de l'activité de lipase ou en augmentant l'excrétion de matières fécales (**El-Newary, 2016**).

Le taux du HDL-c a augmenté d'environ 65.87 % et 85.43 % chez les lots IV et V respectivement et a atteint 88.74 % d'augmentation chez le lot III. Ce résultat est en accord avec la bibliographie (**Nicholls *et al*, 2007**). Etant un inhibiteur de la HMG-CoA réductase, ce médicament entraîne une augmentation des récepteurs à LDL hépatiques, ceci à leur tour entraîne également une augmentation légère des HDL (**Zarei *et al*, 2011**).

Les LDL-c représentent le produit final de la cascade métabolique VLDL-LDL-IDL. Elles sont responsables du transport du cholestérol du foie vers les cellules périphériques. L'excès des particules LDL-c est la cause de l'athérosclérose (**Vergès, 2007**). L'induction de l'hyperlipidémie par le TX-100 a provoqué une augmentation hautement significative au niveau de LDL-c du lot II comparé au lot I. Le taux du LDL-c a diminué de 59.48 % avec la dose de 200 et a baissé d'environ 70.4 % avec la dose de 400 mg/kg, se rapprochant de celle de l'atorvastatine qui marque une chute de 79.33%. Cette réduction a contribué à la restauration des triglycérides à leur niveau normal (lot I). La diminution du LDL-cholestérol est amplement prouvée être une action efficace dans la réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires dans le cadre d'une prise en charge globale du risque d'athérosclérose (**Saile et Hassan, 2007**).

Résultats et discussion

Le cholestérol hépatique pénètre dans la circulation sous forme de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et est métabolisé en lipoprotéines restantes après que la lipoprotéine lipase élimine les triglycérides (Jain *et al*, 2007). A 200 mg/kg, le taux des VLDL a chuté d'environ 28.91 %, et à 400mg/kg, ce pourcentage augmente jusqu'à 38.39 %, pour atteindre 56.17 % de réduction avec le traitement à l'atorvastatine (10 mg/kg).



Résultats et discussion

Figure 21 : dosage du cholestérol total(A) ; triglycérides (B) ; HDL-c(C) ; LDL-c (D) ; VLDL (E). I : control normal; **II :** control hyperlipidémique; **III :** TX-100 (100mg/kg) et l'atorvastatine (10 mg/kg). **IV et V :** TX-100 (100mg/kg) plus 200 et 400 mg / kg de l'extrait de graines respectivement ; Les données ont été exprimées en moyen \pm SEM de (n=5) ; one-way ANOVA pour l'analyse statistique. La différence statistique est considérée significative (*), autement significatif (**) et très hautement significative (****) comparé au lot II.

Le triton x 100 est un agent tensioactif non-ionique biodégradable se présentant sous forme de liquide anhydre à 100 % de matières actives. Il s'agit d'un octylphénoxyéthoxyéthanol soluble en milieu aqueux. Le triton X-100 s'utilise comme émulsifiant, agent de mouillage et détergent. En effet, les agents tensioactifs constituent le moyen le plus pratique actuellement utilisé qui permet de produire une élévation des principaux composants lipidiques du sérum sanguin et en particulier une augmentation parallèle du cholestérol (**Kellner et al, 1950**)

L'induction de l'hyperlipidémie aiguë dans des modèles animaux utilisant le triton X-100 a été largement utilisée pour bloquer le dédouanement des lipoprotéines riches en TAG, tout en augmentant la synthèse hépatique du cholestérol et des triglycérides ou en retardant leur dégradation (**Kellner et al, 1950; Gundamaraju et al, 2014**).

Selon **Kellner et al, (1950)**, le fait que les animaux ayant reçu une injection de triton présentent une diminution modérée du pourcentage d'esters de cholestérol dans le sérum sanguin suggère qu'il peut exister une altération de la fonction hépatique chez ces animaux; d'autre part, il est possible que la diminution du pourcentage d'ester de cholestérol soit simplement le reflet d'une augmentation disproportionnée du cholestérol libre induite par l'agent injecté. Le triton X-100 agit en tant que surfactant et supprime l'action des lipases pour interférer et bloquer l'absorption des lipoprotéines par le tissu extrahépatique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de lipides dans le sang (**Aarati et Aniket, 2015**). L'augmentation de la sécrétion de VLDL par le foie avec une forte réduction du catabolisme des VLDL et des LDL est le mécanisme possible de l'augmentation du cholestérol plasmatique et des TAG après l'injection de Triton X-100 (**Shafik et al, 2017**).

La nature biphasique de l'hyperlipidémie induite par le Triton X 100 est utile pour comprendre le mode d'action des agents hypolipidémiant (**Nanumala et al, 2014**).

Résultats et discussion

L'hyperlipidémie est un trouble métabolique caractérisé par des altérations du profil lipidique et lipoprotéique sérique en raison d'une augmentation de la concentration de cholestérol total, de lipoprotéines de faible densité, de lipoprotéines de très basse densité et de triglycérides avec une diminution concomitante de la concentration de lipoprotéines de haute densité dans la circulation sanguine (**Aarati et Aniket, 2015**). ce qui la rend l'un des facteurs de risque les plus importants dans le développement de l'athérosclérose et de la maladie coronarienne (**Zaburuth et Jayshree, 2014**)

Les résultats de cette étude ont également montré qu'un traitement avec des extraits de graines de *Pinus pinea L* entraînait une réduction de la concentration en triglycérides (de 32,08 à 37,29%), des taux de cholestérol (de 28,08 à 31,5%) et une augmentation des concentrations de HDL (de 37,91 à 58,5%). La diminution significative de la concentration plasmatique de cholestérol, les triglycérides, VLDL-c et LDL-c et l'augmentation des taux de HDL-c après l'administration de doses croissantes (200 et 400 mg / kg) des extraits suggèrent que l'activité anti-cholestérol des extraits peut résulter d'un catabolisme rapide des lipides dans récepteurs hépatiques pour leur élimination finale sous forme d'acides biliaires (**Boukhalifa et al, 2018**).

Fait intéressant, les principaux indicateurs du risque de maladie cardiaque sont les indices athérogènes, car leur augmentation est associée à un risque accru de maladie cardiovasculaire et vice-versa. Dans la présente étude, nous avons observé que les traitements par l'extrait polyphénolique et par l'atorvastatine réduisaient significativement les indices athérogènes chez le rat hyperlipidémique, ce qui confirme leur rôle dans la cardioprotection (**Shafik et al, 2017**).

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. Certains polyphénols possèdent des propriétés anti-oxydantes et captatrices de radicaux libres (**Mais et al, 2017**). Ils protègent les « lipoprotéines de faibles densités » contre l'oxydation. Au niveau de l'endothélium vasculaire, les polyphénols stimulent la production de facteurs relaxants comme le monoxyde d'azote. Par ailleurs, ils contribuent à préserver l'intégrité de l'endothélium vasculaire en agissant à la fois sur la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules endothéliales. Grâce à ces propriétés, les polyphénols pourraient interférer avec le processus athérogène et/ou les phénomènes thrombotiques associés à l'athérosclérose et

Résultats et discussion

pourraient expliquer les effets vasculo et cardio-protecteurs de ces composés (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**)

Les polyphenols sont aussi capables de diminuer d'autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires impliqués dans le syndrome métabolique (hyperglycémie, taux de lipides élevé, insulino-résistance, obésité abdominale). Ainsi, la présence de phyto-composants hypolipidémiques tels que les flavonoïdes dans *Pinus pinea* L pourrait expliquer la bioactivité observée du lors du traitement. D'après (**Amiot et al, 2009**). L'activité biologique des isoflavones, est en partie attribuée aux similarités de structure entre les isoflavones et le 17 β -œstradiol. Le tissu adipeux exprime les deux récepteurs nucléaires à l'œstrogène ER α et ER β . La liaison probable de la génistéine au récepteur ER α , diminue, chez la souris, l'expression de la lipoprotéine lipase, entraînant une inhibition de la lipogenèse.

Selon les études de **Shukla et al, (2016)**, l'un des mécanismes pouvant expliquer cette bioactivité est la présence de composés hypocholestérolémiantes pouvant agir comme inhibiteurs de certaines enzymes telles que l'hydroxyle méthylglutaryl-CoA réductase, qui participe à la synthèse du cholestérol ou réduit l'absorption du cholestérol par l'intestin ou l'extrait pourrait stimuler la production d'insuline qui inhibe à son tour l'activité de la lipoprotéine lipase. Par ailleurs, les études menées par (**Zaburuth Nisha et Jayshree, 2014**), il a été montré que l'inhibition de la lipase pancréatique responsable de l'hydrolyse des lipides en acides gras et en monoglycérides, joue un rôle important dans le traitement de l'hyperlipidémie.

IV.2 Etude histopathologique

IV.2.1 Histologie du foie

Les **figures (22 ;23 ; 24 ; 25 et 26)** représentent respectivement des coupes histologiques du foie colorées avec l'hémalun/éosine; lot I (control normal), lot II (control hyperlipidémique) et lot III (groupe traité avec l'atorvastatine), IV et V (traité avec des doses respectives de 200 et 400mg/kg de l'extrait polyphenolique de *Pinus pinea* L.)

La (**figure 22**) représente une coupe histologique du foie d'un rat témoin non traité (lot I), qui révèle un aspect normal sans modification hépatiques, les hépatocytes s'organisent de façon radiale autours des veines centro-lobulaires (VC) qui reçoit le sang à partir du parenchyme hépatique au contacte des sinusoides.

Résultats et discussion

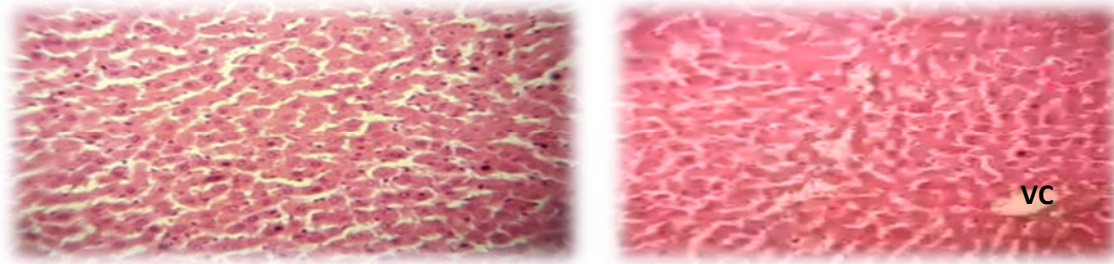


Figure 22: coupe histologique du foie du rat témoin montrant une architecture normale du foie, vu au G×40.

Le foie d'un rat du lot II (lot hyperlipidémique) (**Figure 23**) montre une infiltration graisseuse et une dégénérescence granulaire; ceci indique que le Triton X-100 induit une diffusion massive des lipides à l'intérieur des hépatocytes, ce qui provoque une disposition intra hépatique de ces lipides sous forme de petites vacuoles optiquement visibles et vides.

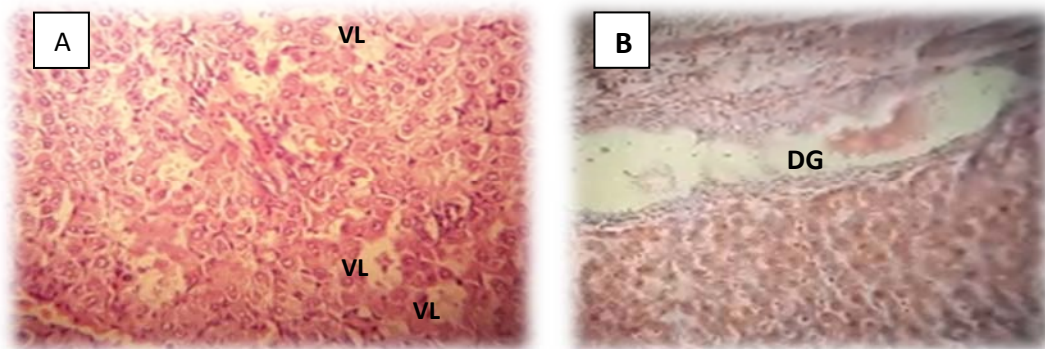


Figure 23: coupe histologique du foie d'un rat hyperlipidémique montrant une infiltration lipidique au niveau des cellules hépatiques sous forme de VL (vacuoles lipidiques) (A) et une dégénérescence granulaire (DG) importante (B).

Le foie d'un rat du groupe III (groupe traité avec un standard (atorvastatine 10 mg / kg) (**figure 24**) présentant une infiltration de graisse cytoplasmique négligeable comparant au foie du groupe témoin. Ces observations signifient que ce traitement a réduit le volume et le nombre des vacuoles lipidiques diminuant l'effet de la stéatose hépatique due au Triton X-100.



Figure 24: coupe histologique du foie d'un rat traité avec l'atorvastatine (10 mg/kg) montrant absence presque totale des globules lipidiques, vue au G $\times 40$.

La (**figure 25**) qui représente une coupe du foie d'un rat du lot IV (200mg/kg de l'extrait par voie orale), montre l'apparition des petites vacuoles lipidique qui se diffusent dans les hépatocytes. Ce qui signifie qu'à cette dose de l'extrait, les vacuoles persistent toujours.

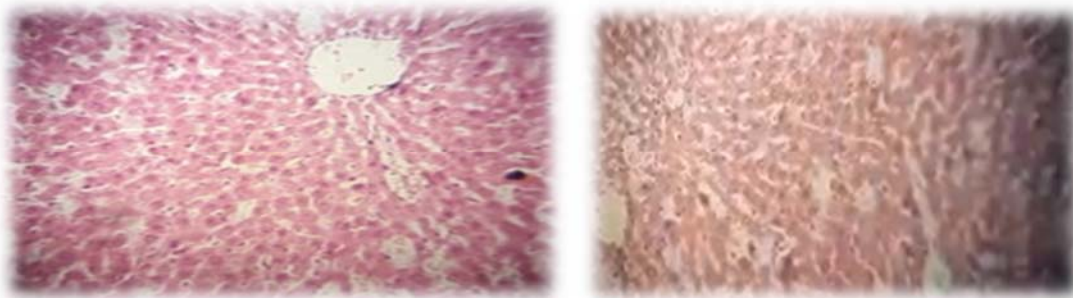


Figure 25 : Coupe histologique du rat du groupe traité a 200 mg/kg de l'extrait polyphenolique montrant une infiltration graisseuse persistante vu au G $\times 40$.

Par contre, la coupe histologique d'un rat du lot V (400mg/kg de l'extrait par voie orale) (**Figure 26**) montre des petites vacuoles lipidiques qui sont présentes dans les hépatocyte, mais elles sont moins importantes en comparaison avec les vacuoles marquées dans le lot II (hyperlipidémique) et le lot III (200mg/kg de l'extrait par voie orale).



Figure 26 : Micrographie histologique du groupe V (traitement avec 400 mg/kg de l'extrait) montrant de petites vacuoles lipidiques négligeables et une dégénérescence granulaire moins importante vu au G $\times 40$.

IV.2.2 Histologie du cœur

Les **figures (27, 28, 29, 30 et 31)** représentent respectivement des coupes histologiques du cœur colorées avec l'hématoxyline/éosine réalisées après 24 heures qui suit le traitement; lot I (control normal), lot II (control hyperlipidémique) et lot III (traité avec de l'atorvastatine 10/mg), IV et V (traité avec des doses respectives de 200 et 400mg/kg de l'extrait de polyphenols des graines de *Pinus pinea L.*).

La (**figure 27**) représente une coupe histologique du cœur d'un rat témoin non traité (lot I), qui révèle un aspect normal du muscle cardiaque (myocarde) qui est constitué d'une part de cardiomyocytes, cellules musculaires striées et d'autre part de l'espace interstitiel.

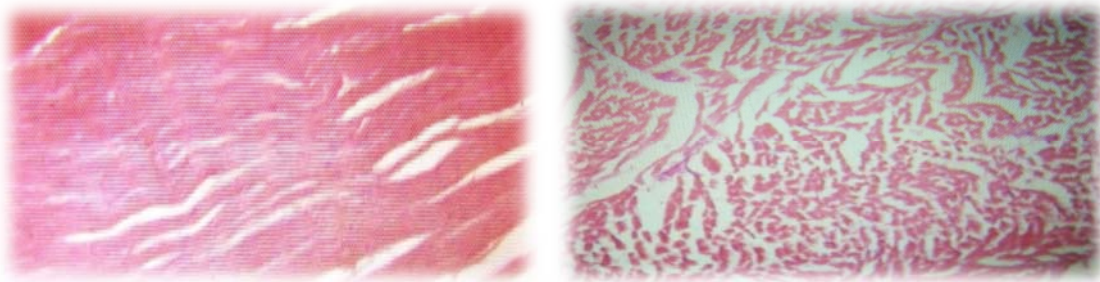


Figure 27 : Coupe histologique du cœur d'un du lot témoin normale révélant un aspect normal et une organisation architecturale stable du myocarde vue au G $\times 40$.

La (**figure 28**) représente une coupe histologique du cœur d'un rat hyperlipidémique, montrant des fibres myocardiques augmentées de volume et vacuolisées par la surcharge lipidiques et un strie lipidique formée d'amas de macrophages (cellules spumeuses), en comparaison avec le lot témoin non traité (lot I).

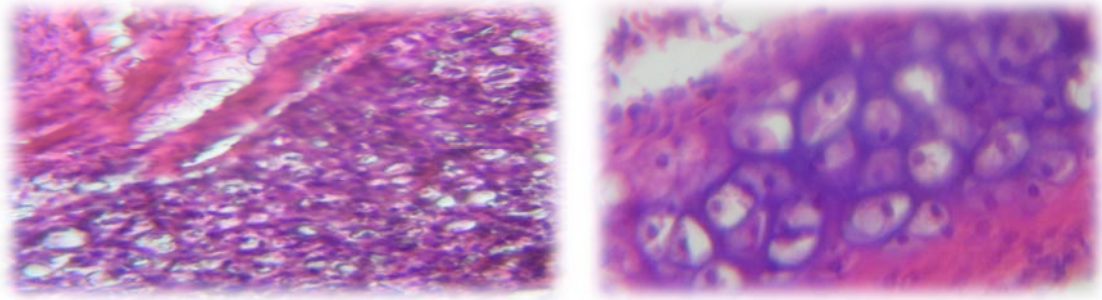


Figure 28 : La micrographie histologique du groupe II (hyperlipidémie) montrant une infiltration graisseuse excessive et diffuse du myocarde, vue au G $\times 40$.

La (**figure 29**) représente la coupe histologique du cœur d'un rat traité avec l'atorvastatine à (10 mg/kg), montrant la disparition des vacuoles lipidiques qui infiltrent le muscle cardiaque, l'atorvastatine a restitué l'architecture normale du tissu cardiaque ce qui signifie que ce traitement est efficace contre l'hyperlipidémie induite par le triton X-100.

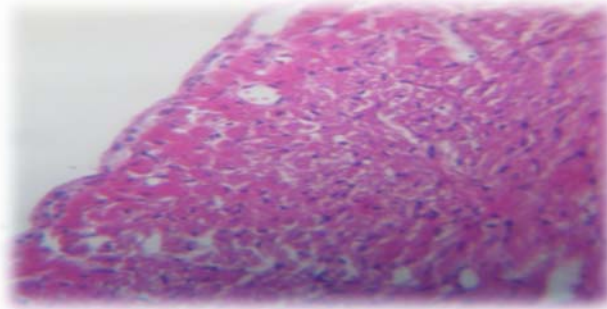


Figure 29: Micrographie histologique du groupe III (traitement avec l'atorvastatine) montrant un muscle cardiaque sans dégénérescence avec des vacuoles lipidiques négligeables, vue au G $\times 40$.

La (**figure 30**) représente la coupe histologique d'un rat du groupe traité avec la dose de 200 mg/kg de l'extrait polyphénolique, montrant une infiltration graisseuse qui persiste au niveau du muscle cardiaque, et des cellules spumeuses regroupées en amas. Ce résultat indique que la dose 200 mg /kg de l'extrait polyphénolique présente une efficacité faible contre l'hyperlipidémie induite par le Triton X-100, en comparant avec le traitement avec l'atorvastatine (10 mg/kg).

Résultats et discussion

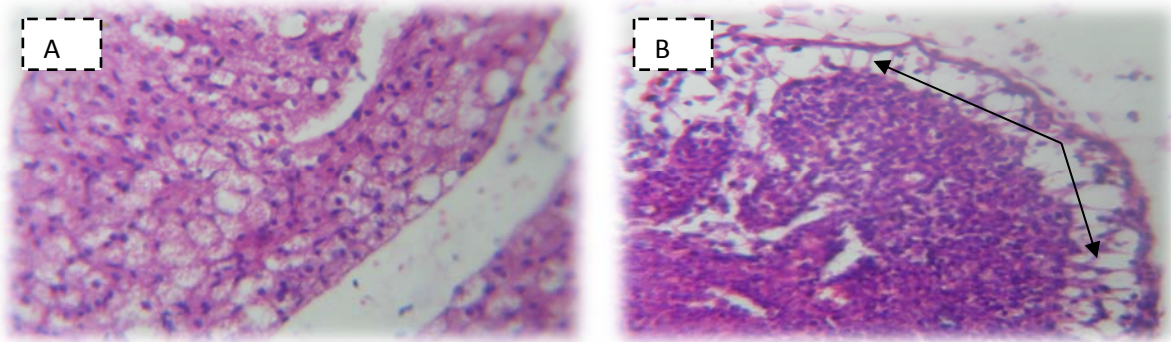


Figure 30 : Micrographie histologique du groupe IV (traitement avec 200 mg/kg de l'extrait) montrant un muscle cardiaque à infiltration graisseuse modérée (A) et des cellules spumeuses (B), vu au G \times 40.

La (**figure 31**) qui représente la coupe histologique du cœur d'un rat du lot V (400mg/kg de l'extrait par voie orale) montre une accumulation lipidique remarquable en comparaison avec le lot témoin (lot I), et modérée si on la compare avec le lot IV traité avec la plus faible dose de l'extrait qui est de 200mg/kg, une sédimentation peu importante des cellules spumeuses au niveau de l'adventice en comparaison avec le lot IV.

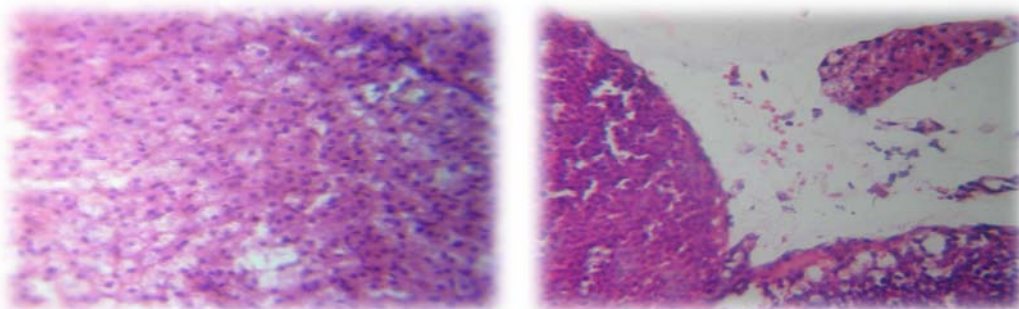


Figure 31 : Micrographie histologique du groupe V (traitement avec 400 mg/kg de l'extrait) montrant un muscle cardiaque à petite vacuoles lipidique qui infiltre le muscle cardiaque, vu au G \times 40.

Cette partie de notre travail a pour but de révéler l'effet bénéfique de l'extrait polyphénolique de *Pinus pinea* L, sur les dépôts lipidiques aux niveaux des artères coronariennes et du parenchyme hépatique, en effectuant une comparaison inter lots en fonction des doses de l'extrait administré, par rapport aux lots témoin (control normal), hyperlipidémique (control hyperlipidémique) et celui traité avec l'atorvastatine.

Nos résultats montrent que le triton X-100 provoque une hyperlipidémie aiguë très importante aux niveaux des rats du lot II, ce qui explique d'ailleurs la présence des cellules

Résultats et discussion

spumeuses et des vacuoles lipidiques respectivement aux niveaux du cœur et du foie des rats de même lot. Donc, le triton X-100 a pu déclencher un début d'athérosclérose et une microstéatose au niveau du foie. Une diminution significative de l'agrégation des cellules spumeuses et des vacuoles lipidiques au niveau du foie a été observée chez les rats des lots III, IV et V. Cette diminution est en fonction de la concentration de la dose de l'extrait administré, plus la concentration est élevée plus la diminution est importante. Ces résultats indiquent que l'extrait polyphénolique est efficace pour diminuer le risque de déclenchement d'athérosclérose et de stéatose hépatique, par la diminution remarquable des vacuoles lipidiques, agissant ainsi comme des anti-hyperlipidémiantes ce qui confirme notre étude biochimique.

Le médicament anti hyperlipidémiant (atorvastatine) semble efficace pour prévenir l'augmentation des niveaux du cholestérol plasmatique (**Aarati et al, 2015**). Cependant, les statines peuvent induire des effets indésirables musculaires allant de la diminution de la force musculaire, l'augmentation des transaminases, les hépatites...etc. (**Lièvre et Cucherat 2005**)

L'extrait polyphénolique a restitué l'architecture normale du foie. La disparition de la stéatose est très importante et peut être expliquée soit par l'activation des lipases qui ont été bloquées par le Triton X-100 ou par l'activation du métabolisme des lipides ingérés, puisque ceux-ci ne sont pas stockés au niveau du foie (**Itaya et Igarashi, 1992**).

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les phytomolécules contribuent de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouvelles méthodologies de synthèse et la préparation de molécules à usage thérapeutique constituent un objectif majeur et une préoccupation permanente pour de nombreux chercheurs. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et à l'évaluation du pouvoir hypolépimiant et antioxydant de l'extrait polyphenolique des graines de *Pinus pinea* L, issues des hauteurs de Chréa.

Il ressort clairement de cette synthèse que le traitement avec l'extrait polyphenolique des graines de *Pinus pinea* L a diminué le taux du cholestérol, triglycérides plasmiqes et des LDL-c chez les rats hyperlipidémiques. Ce traitement présentait des effets cardioprotecteurs synergiques contre l'hyperlipidémie, qui pourraient être modulés par l'athérosclérose ainsi que par des lésions cardiaques et aortiques et / ou l'activation de voies anti-inflammatoires et antioxydantes, inversant ainsi le dysfonctionnement endothélial. D'autant plus, l'extrait polyphenolique de *Pinus pinea* L a un effet hypolipémiant et est efficace pour réduire le risque d'épidémie de stéatose hépatique. Cependant, la clarification des mécanismes générant ces activités nécessite davantage d'investigations.

A l'issue de ce travail, on a montré que *Pinus pinea* L exhibe une activité antioxydante élevée mise en évidence via différents systèmes : DPPH, ABTS et FRAP. Si bien que les résultats obtenus confirment que l'extrait éthanolique est doué d'un fort pouvoir antioxydant, en raison de sa composition en polyphenols, des travaux sont nécessaires pour isoler et identifier les composés responsables de cette activité antioxydante élevée, car le terme polyphenols est une appellation générique désignant un vaste ensemble de substances aux structures variées difficile à définir directement.

L'ensemble de ces résultats obtenus constitue une première étape de criblage des substances naturelles à effet thérapeutique. Il serait donc intéressant de :

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

Conclusion et perspectives

-Compléter cette recherche par l'étude de la toxicité sub-chronique et chronique de l'extrait polyphénolique de *Pinus pinea* L, afin de voir s'il y'aura des effets toxiques à long terme et tester son efficacité contre les hyperlipidémies sub-chronique et chronique.

-L'évaluation de l'effet d'autres concentrations pour les tests in vivo et des effets protecteurs d'un traitement combiné par les polyphénols et l'atorvastatine contre les lésions cardiaques et hépatiques.

-L'innovation et le développement de nouvelles méthodologies d'extraction dans le but d'améliorer l'extraction des polyphénols, du laboratoire à la production industrielle car dans l'ensemble, les traitements par sonication, en tant que mode physique de transformation des aliments, ont un fort potentiel à être exploré pour les applications industrielles en tant que méthode efficace pour l'environnement, permettant d'améliorer l'extractabilité des antioxydants naturels, et pourraient donc jouer un rôle important dans la prévention de plusieurs maladies physiologiques et dégénératives chez les consommateurs.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-Aarati , & Aniket K .(2015). Anti-Atherosclerosis Activity of Seed oil of PunicaGranatum Linn in Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. *International Journal of Advanced Research*, 10(3), 1276 – 1280.

2-Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., & Zeng, X. (2014). Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 93-97.

3-Amiot, M. J., Riollet, C., & Landrier, J. F. (2009). Polyphénols et syndrome métabolique: Polyphenols and metabolic syndrome. *Médecine des maladies Métaboliques*, 3(5), 476-482.

4-Amri, I., Gargouri, S., Hamrouni, L., Hanana, M., Fezzani, T., & Jamoussi, B. (2012). Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of Pinus pinea essential oil. *Journal of Pest science*, 85(2), 199-207.

5-Attia-Skhiri, N., Fournier, N., Pourci, M. L., & Paul, J. L. (2009, September). Acides gras trans: effets sur le métabolisme des lipoprotéines et le risque cardiovasculaire. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 67, No. 5, pp. 517-523).

6-Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de Fredolia aretioides de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.

7-Berthélémy, S. (2014). Le bilan lipidique. *Actualités Pharmaceutiques*, 53(534), 59-61. 7.

Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq. *Nature Technology*, (9), 14.

8-Boularab, Y. (2018). *Les dyslipidémies: mise au point* (Doctoral dissertation).

9-Boukhalfa, F., Kadri, N., Bouchemel, S., Ait Cheikh, S., Chebout, I., Madani, K., & Mais, B., Yaser, A. M., & Ream, N. (2016). Hypolipidemic effect of Achillea biebersteinii

Références bibliographiques

ethanolic extract in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(9), 1555-1559.

10-Boukhalfa, F., Kadri, N., Bouchemel, S., Ait Cheikh, S., Chebout, I., Madani, K., & Chibane, M. (2018). Antioxidant activity and Hypolipidemic effect of Ficus carica leaf and twig extracts in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 11(1), 37-50.

11-Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier 3:286-347.

12-Bruckert, E. (2001). Fonctionnalité des lipides dans le contexte d'une relation alimentation-santé. Les phytostérols, place dans la prise en charge du patient hyperlipidémique. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 8(4), 312-316.

13-cc, F., Keshavarz, A., Hosseini, S., Ameri, A., & Yarahmadi, S. (2008). Effects of omega-3 fatty acid supplements on serum lipids, apolipoproteins and malondialdehyde in type 2 diabetes patients.

14-Celestino, C., Carneros, E., González-Cabrero, N., Hernández, I., & Toribio, M. (2018). Stone Pine Pinus pinea L. In *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*(pp. 63-81). Springer, Cham.

15-Charrier, S. 2004. Le Pin parasol, Pinus pinea Linné, 1753, en Vendée, le naturaliste vendéen, 4 : 45 – 55.

16-Chardigny, J. M., & Malpuech-Brugere, C. (2007). Acides gras trans et conjugués: origine et effets nutritionnels. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21(1), 46-51.

17-Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2008). Sterol composition of black cumin (Nigella sativa L.) and Aleppo pine (Pinus halepensis Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2), 162-168.

18-Chibane, M. (2018). Antioxidant activity and Hypolipidemic effect of Ficus carica leaf and twig extracts in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 11(1), 37-50.

Références bibliographiques

- 19-Conde, E., Cara ,C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., & Dominguez H (2009) .** Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry* 33:67-87.
- 20-Cugnet, C., Marcais, C., Charrière, S., Guitard-Moret, M., Decaudain, A., Sassolas, A., & Moulin, P. (2008).** Génétique des hypertriglycéridémies. *Médecine des maladies métaboliques*, 2(1), 15-22.
- 21-De Quirós, A., Frecha-Ferreiro, A., Vidal-Pérez, A., & López-Hernández, J.(2010).** Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research and Technology* 231:495-498.
- 22-Do,Q., Angkawijaya A, Tran-Nguyen, P., Huynh, L., Soetaredjo, F., Ismadji, S., & Ju Y. (2013).**Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*:1-7.
- 23-Dominguez-Lerena, S., Sierra, N. H., Manzano, I. C., Bueno, L. O., Rubira, J. P., & Mexal, J. G. (2006).** Container characteristics influence *Pinus pinea* seedling development in the nursery and field. *Forest Ecology and Management*, 221(1-3), 63-71.
- 24-Duriez, P. (2004).** Mécanismes de formation de la plaque d'athérome. *La revue de médecine interne*, 25, S3-S6.
- 25-El-Newary, S. A. (2016).**The hypolipidemic effect of *Portulacaoleracea* L. stem on hyperlipidemic Wister Albino rats. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 111-124.
- 26-Evans, D., Seedorf, U., & Beil, F. U. (2005).** Polymorphisms in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene and type III hyperlipidemia. *Clinical genetics*, 68(4), 369-372.
- 27-Farnier, M. (2007).** Dyslipidémie de l'obésité abdominale: mécanismes et caractéristiques (partie I).
- 28-Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Bouchentouf, S., & Costa, J. (2019).** In vitro Assessment of Two Species of the Genus *Pinus* Growing in Algeria for their Antimicrobial and Antioxidant Activity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 84(1), 103-114.
- 29-Fossati, P., & Prencipe, L. (1982).** Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*, 28(10), 2077-2080.

Références bibliographiques

- 30-Friedewald, T., Levy, I., & Fredrickson, S. (1972).** Estimation of the concentration of lowdensity lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinicalchemistry*, 18(6), 499-502.
- 31-Itaya, S., & Igarashi, K. (1992).** Effects of taxifolin on the serum cholesterol level in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(9), 1492-1494.
- 32-Gernandt, D. S., Vining, T. F., Campbell, C. S., Piñero, D., & Liston, A. (1999, August).** Molecular phylogeny of Pinaceae and Pinus. In *IV International Conifer Conference 615* (pp. 107-114).
- 33-Gernandt, D. S., López, G. G., García, S. O., & Liston, A. (2005).** Phylogeny and classification of Pinus. *Taxon*, 54(1), 29-42.
- 34-Gheffour, K., Boucherit, K., & Boucherit-Otmani, Z. (2015).** Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'Echinops spinosus. *Phytothérapie*, 13(5), 288-294.
- 35-Glorian, M., & Limon, I. (2007).** L'athérosclérose, une maladie inflammatoire. *Revue Francophone des laboratoires*, 2007(389), 43-48.
- 36-Gundamaraju, R., Hwi, K. K., Singla, R. K., Vemuri, R. C., & Mulapalli, S. B. (2014).** Antihyperlipidemic potential of Albizia amara (Roxb) Boiv. bark against Triton X-100 induced hyperlipidemic condition in rats. *Pharmacognosy research*, 6(4), 267.
- 37-Gupta, A., Sehgal, V., & Mehan, S. (2011).** Hyperlipidemia: An updated review. *Inter J Biopharmaceutical Toxicol Res*, 1, 81-89.
- 38-Gontier, E., Gougeon, S., Guillot, X., Thomasset, B., Méjean, L., Trân, T. L. M., & Bourgaud, F. (2004).** Les plantes, sources d'acides gras essentiels oméga 3. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 11(2), 106-111.
- 39-Hadjer, A., & Sabrina, S.** Etude préliminaire sur l'effet des extraits de Fraxinus angustifolia et Clematis flammula sur l'hypercholestérolémie et la dyslipidémie chez les souris.

Références bibliographiques

- 40-Heim EK, Tagliaferro, AR ., & Bobilya, DJ.(2002)** Flavonoïds antioxydants : chemistry ; metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry* 13:152-584.
- 41-Jain, K. S., Kathiravan, M. K., Somani, R. S., & Shishoo, C. J. (2007).** The biology and chemistry of hyperlipidemia. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(14), 4674-4699.
- 42-Kadri, N. (2014).** *Graines de Pinus SP: caractérisation physico-chimique et activité anticancéreuse* (Doctoral dissertation, Montpellier 2).
- 43-Kellner, A., Correll, J. W., & Ladd, A. T. (1951).** Sustained hyperlipemia induced in rabbits by means of intravenously injected surface-active agents. *Journal of Experimental Medicine*, 93(4), 373-383.
- 44-Kholkhal, F., Lazouni, H. A., Bendahou, M., Boublenza, I., Chabane, S. D., & Chaouch, T. (2013).** Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus* ssp. *Coloratus*. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 9(1), 151-158.
- 45-Kim, J. A., Montagnani, M., Chandrasekran, S., & Quon, M. J. (2012).** Role of lipotoxicity in endothelial dysfunction. *Heart failure clinics*, 8(4), 589-607.
- 46-Lagrost, L., Masson, D., & Chapman, J.(2004).** Lipoprotéines et métabolisme lipidique. L'athérosclérose : Physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques, 59-77.
- 47-Leong, L. P., & Shui, G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*, 76(1), 69-75.
- 48-Lièvre, M., & Cucherat, M. (2006).** Les statines: données factuelles 2005 (no 2). *Médecine*, 2(2), 58-62.
- 49-Locatelli, M., Gingro, R., Travaglia, F., Coisson, JD., Maurizio,R., & Arlorio M. (2009).** Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry* 114:889-897.
- 50-Macchioni, F., Cioni, P. L., Flamini, G., Morelli, I., Maccioni, S., & Ansaldi, M. (2003).** Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus*

Références bibliographiques

pinea, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(2), 139-143.

51-Magnan, C. (2006). Lipotoxicité et insulino-résistance. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(2), 108-113.

52-Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002, December). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* (Vol. 51, No. 6, pp. 304-315). Elsevier Masson.

53-Mattern, H. M., & Hardin, C. D. (2007). Vascular metabolic dysfunction and lipotoxicity. *Physiological research*, 56(2).

54-Nanumala, S. K., Nischal, Y., Sarika, M., & Shrivaya, S. S. (2014). Hypolipidemic activity of ethanolic extracts of *Cassia angustifolia* in Triton X 100 induced hyperlipidemia in rats. *Asian J Pharm Clin Res*, 7(1), 189-191.

55-Nasri, N., Khaldi, A., Fady, B., & Triki, S. (2005). Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: composition and population profiling. *Phytochemistry*, 66(14), 1729-1735.

56-Nergiz, C., & Dönmez, I. (2004). Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry*, 86(3), 365-368.

57-Nicholls, J., Tuzcu, M., Sipahi, I., Grasso, W., Schoenhagen, P., Hu, T., & Kapadia, S. R. (2007). Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. *Journal of the American Medical Association*, 297(5), 499-508.

58-Pacifico, S., Piccolella, S., Nocera, P., Tranquillo, E., Dal Poggetto, F., & Catauro, M. (2019). New insights into phenol and polyphenol composition of *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 163, 45-57.

59-Paul, J. L., & Baudin, B. (2009). Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces. *Revue francophone des laboratoires*, 2009(409), 41-50.

60-Penpoul, C., & Laplace, S. (2017). Développer la filière pignon de pin dans le Var. *Forêt méditerranéenne*.

Références bibliographiques

- 61-Pesce, M. A., & Bodourian, S. H. (1976).** Enzymatic rate method for measuring cholesterol in serum. *Clinical chemistry*, 22(12), 2042-2045.
- 62-Popovici C, Saykova L and Tylkowski B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* 4:25-39.
- 63-Ruiz, J. (2000).** Bases génétiques des dyslipidémies. *Néphrologie*, 21(7), 323-326.
- 64-Saile, R., & Hassan, T. (2007).** Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose: de la biochimie à la physiopathologie. *Les technologies de laboratoire*, 2(2).
- 65-Sarr, S. O., Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., & Diop, Y. M. (2015).** Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1263-1269.
- 66-Sbat,H., & Hadjib.S, (2016).** Le pin pignon : une espece de choix dans lecontext du changement climatique,centre de recherche forredtiere, 2509-1220.
- 67-Seladji, D.** Compositions chimiques, proprietes antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des racines de trois pinaceae d'algerie (Doctoral dissertation).
- 68-Sentilhes, L., & Bacq, Y. (2008).** La cholestase intrahépatique gravidique. *Journal de Gynecologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 37(2), 118-126.
- 69-Shafik, N. M., Baalash, A., & Ebeid, A. M. (2017).** Synergistic cardioprotective effects of combined chromium picolinate and atorvastatin treatment in triton X-100-induced hyperlipidemia in rats: impact on some biochemical markers. *Biological trace element research*, 180(2), 255-264.
- 70-Shattat, G. F. (2015).** A review article on hyperlipidemia: types, treatments and new drug targets. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 7(1), 399-409.
- 71-Shukla, A. K., Bigoniya, P., & Soni, P. (2015).** Hypolipidemic activity of *Lepidium sativum* Linn. seed in rats. *IOSR J Pharm Biol Sci*, 10(4), 13-22.
- 72-Soutar, A. K., & Naoumova, R. P. (2007).** Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nature Reviews Cardiology*, 4(4), 214.

Références bibliographiques

- 73-Summers, S. A. (2006).** Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in lipid research*, 45(1), 42-72.
- 74-Tedgui, A., & Mallat, Z. (2001).** Athérosclérose et inflammation.
- 75-Thiombiano, L. P., Mbaye, A., Sarr, S. A., Ngaide, A. A., Kane, A., Diao, M., ... & Ba, S. A. (2016, April).** Prévalence de la dyslipidémie dans la population rurale de Guéoul (Sénégal). In *Annales de cardiologie et d'angiologie* (Vol. 65, No. 2, pp. 77-80). Elsevier Masson.
- 76-Torres De Pinedo A, Pen Alver P and Morales JC. (2007).** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chemistry* 103:55-61.
- 77-Valla, D. C. (2013).** Cholestase. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive*, 20(8), 618-627.
- 78-Varret, M., Rabès, J. P., & Boileau, C. (1997).** L'hypercholestérolémie familiale 25 ans après. I-Défauts du récepteur des LDL.
- 79-Vergès, B. (2007).** Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21(1), 9-16.
- 80-Walrand, S., Fisch, F., & Bourre, J. M. (2010).** Tous les acides gras saturés ont-ils le même effet métabolique?. *Nutrition clinique et métabolisme*, 24(2), 63-75.
- 81-Whitfield, M. (2017).** *Modèle murin invalidé pour les LXRs: dyslipidémie et impact sur la maturation post-testiculaire des gamètes* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne).
- 82-Zaburuth Nisha, S., & Jayshree, N.(2009)** Anti-pancreatic lipase activity of leaves of operculina turpethum. *international journal of institutional pharmacy and life sciences*. 4(2), 2249-6807.
- 83-Zahin, M., Aqil, F., & Ahmad, I. (2009).** The in vitro antioxidant activity and total phenolic content of four Indian medicinal plants. *International Journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences*, 1(1), 88-95.

Références bibliographiques

84-Zarei, A., Ashtiyani, S., Mohamadi, A., & Gabari, A. (2011). The effects of PhysalisAlkekengi extract on lipids concentrations in rats. Arak Medical University Journal, 14(2), 36-42.

Annexes

Annexe 01 :



Figure 01 : Animalerie du centre de recherche et développement SAIDAL (originale)

Annexe 02 :

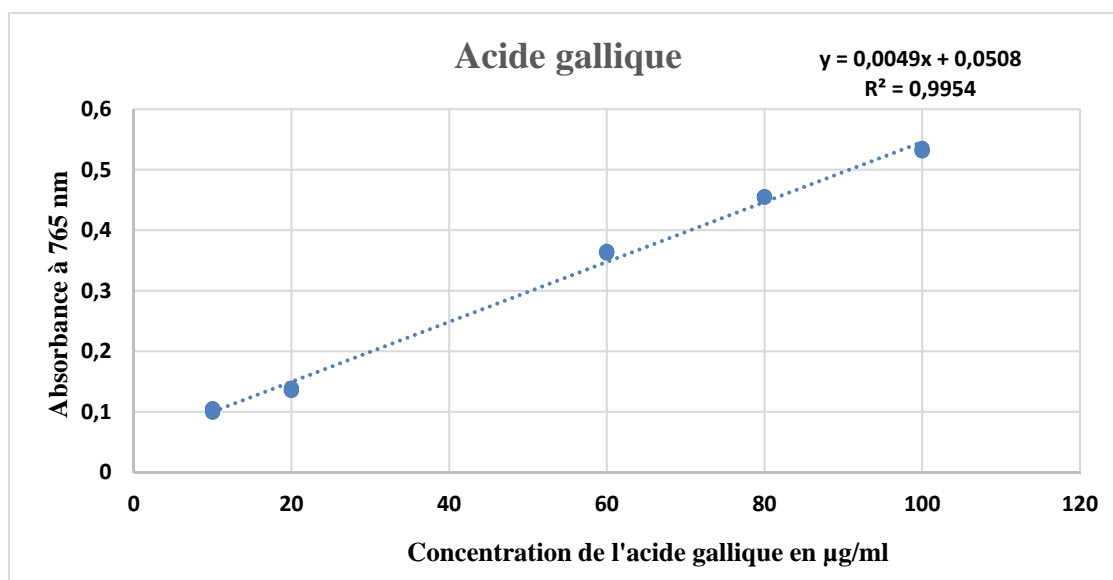


Figure 02 : Courbe d'étalonnage du standard acide gallique utilisé dans le dosage des polyphénols totaux.

Annexe 03 :

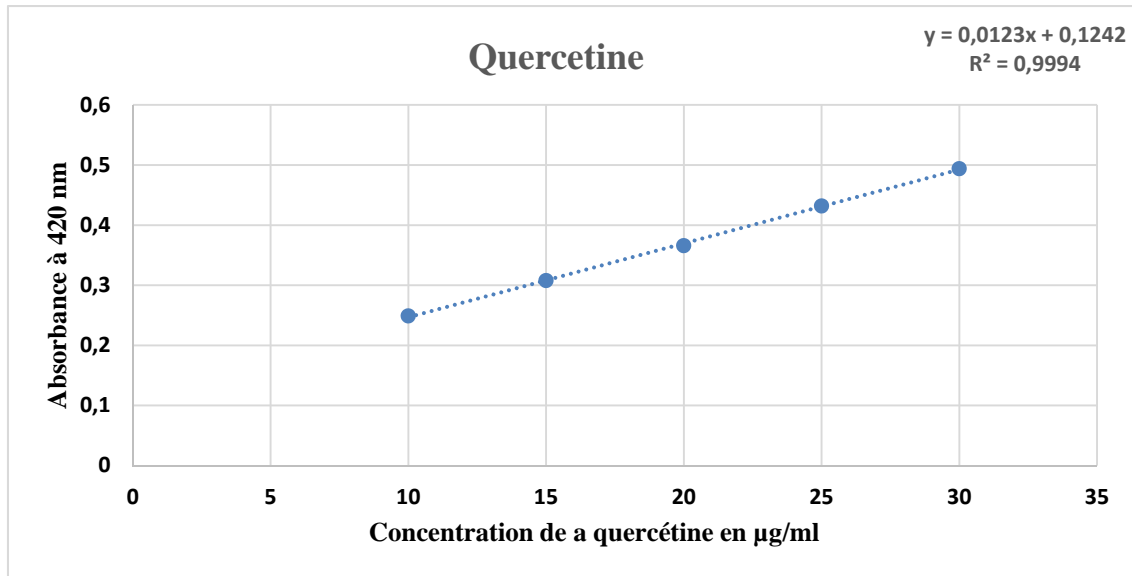


Figure 03 : Courbe d'étalonnage du standard Quercétine utilisé dans le dosage des flavonoïdes.

Annexe 04 :

Tableau.III. Valeurs normales du bilan lipidique chez un adulte sans facteur de risque

Cholestérol total	< 2.0 g/L (< 5.2 mmol/L)
Triglycérides	< 1.5 g/L (< 1.7 mmol/L)
LDL-cholestérol	< 1.6 g/L (< 4.1 mmol/L)
HDL-cholestérol	> 0.4 g/L (> 1 mmol/L)

Annexe 05 :



Figure 04: fixation des organes dans une solution de formol.

Annexe 06 :



Figure 05: Déshydratation des organes.

Annexe 07 :



Figure 06: étape de paraffinage des organes prélevés.

Annexe 08 :

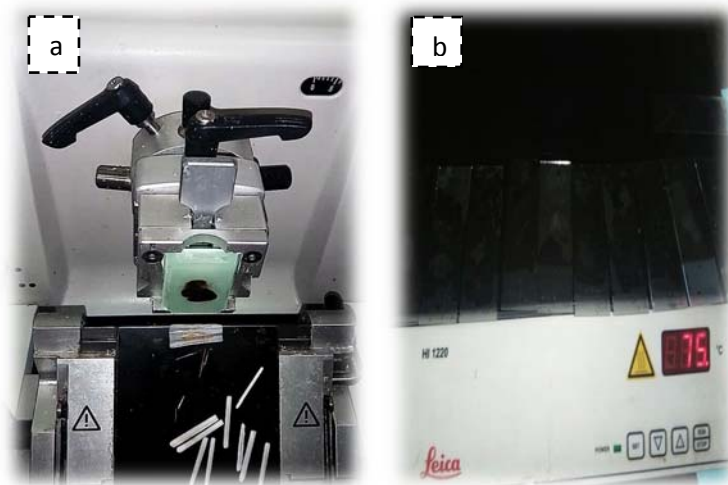


Figure 07: (A) réalisation des coupes histologiques et (B) séchage.

Annexe 09 :



Figure 08: A gauche : étape de coloration des coupes : (1) et (2) xylène ; (3) alcool 100% (4) alcool 90% ; (5) alcool 70% ; (6) Hémalum ; (7) éosine ; (8) alcool 70% ; (9) alcool 90% et à droite: coupes histologiques colorées.

Annexe 10:

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

Paramètres	TC	TG	HDL	LDL	VLDL	AI
groupe I	0.86±0.036****	0.77±0.10****	0.426±0.05*	0.28±0.05****	0.155±0.02****	2.05±0.2
Groupe II	2.49 ±0.4	2.11 ±0.27	0.302 ±0.05	1.79 ±0.03	0.422±0.04	8.5±1.5
Groupe III	1.138±0.048****	0.93±0.01****	0.57±0.02****	0.37±0.05****	0.185±0.02****	1.99±0.1
Groupe IV	1.57 ±0.04****	1.51±0.03****	0.51±0.01****	0.74±0.03****	0.30±0.01****	2.97±0.05
Groupe V	1.36 ±0.04****	1.32 ±0.05****	0.57±0.03****	0.52±0.06****	0.26±0.01****	2.38±0.1

Les données sont présentées sous forme de moyenne de cinq répétitions ± erreurs types des moyennes. Une analyse ANOVA à une voie a été utilisée suivie d'un test post Hoc pour des comparaisons multiples, La différence statistique est considérée significative (*), autement significatif(**) et très hautement significative (****) comparé au lot II. **VLDL-C**= TG/5, **LDL-C**= TC- HDL- (TG/5), **AI** a été calculé par la formule de Schulpis: **Atherogenic Index (AI)**: TC- Total sérum / HDL-C Total sérum. **I** : groupe normal ; **II** : groupe hyperlipidémique ; groupe **III** : groupe traité avec l'atorvastatine (10 mg/kg) ; groupe **IV** : groupe traité avec l'extrait de *Pinus pinea L* (200 mg/kg) ; groupe **V** : groupe traité avec l'extrait de *Pinus pinea L* (400 mg/kg).

Annexe 11 :

Préparation de la solution tampon phosphate :

-Dissoudre 35.61 g de Na₂HPO₄ · 2H₂O et 27.6 g de NaH₂PO₄ · H₂O séparément dans l'eau.

-Ajuster le volume de chaque solution a 1000 ml

-Mélanger les solutions mères comme suite : pour 50 ml, 38.5ml de Na₂ HPO₄-2H₂O et 11.5 ml de NaH₂PO₄- H₂O

-Vérifier le ph de la solution a la température ambiante et ajuster le PH à 6.6.

Résumé

Pinus pinea L connue sous le nom de pin pignon est un conifère endémique du bassin méditerranéen, où les graines font partie du régime bien reconnu en tant que régime alimentaire qui réduit certains facteurs de risque du syndrome métabolique. Ses propriétés biologiques sont attribuées à sa richesse en composés phénoliques. La présente étude a été conçue pour étudier l'activité antihyperlipidémique des graines de *Pinus pinea* L à des doses de 200 et 400 mg/kg du poids corporel, sur des rats *Wistar Albinos* hyperlipidémiques suite à l'injection du Triton X-100 à une dose 100 mg /kg de poids corporel. De plus, les teneurs en polyphénols et flavonoïdes de cet extrait et leur activité antioxydante a été déterminée. Ces propriétés peuvent avoir un effet synergique sur l'hyperlipidémie. L'étude de l'activité antioxydante de composés phénoliques a été déterminée par les tests radicaux DPPH, ABTS⁺ et FRAP. Les résultats des composés phénoliques et flavonoïdes des graines de *Pinus pinea* L étaient de 8.9 mg d'équivalent acide gallique (GAE) et 0.1 mg équivalent de quercétine EQ / g de matière sèche, respectivement. L'activité de piégeage (IC50) contre les radicaux DPPH * et ABTS⁺ a varié de 20 à 7 g / mL. Les résultats ont révélé que l'administration d'extrait de graines de *Pinus pinea* L entraînait une baisse significative des concentrations sériques de triglycérides, de cholestérol total, de LDL-c et de VLDL-c, qui dépend également de la dose administrée. A l'égard de ces résultats, nous pouvons dire que l'extrait serait utile dans le traitement de l'hyperlipidémie et la prévention de maladies cardiovasculaires, et trouvera une importante application dans l'industrie pharmaceutique.

Mots clés : *Pinus pinea* L, polyphénols, hyperlipidémie, triton X-100, activité antioxydante, effet hypolipimiant.

Abstract

Pinus pinea L known as pinion pine is an endemic conifer of the Mediterranean basin, where the seeds are part of the well-recognized diet as a diet which reduces certain risk factors of metabolic syndrome. Its biological properties are attributed to its richness in phenolic compounds. The present study was designed to study the antihyperlipidemic activity of *Pinus pinea* L seeds at doses of 200 and 400 mg / kg body weight, in hyperlipidemic *Wistar Albino* rats following injection of Triton X-100 at a dose of 100 mg / kg body weight. In addition, the polyphenol and flavonoid contents of this extract and their antioxidant activity was determined. These properties may have a synergistic effect on hyperlipidemia. The study of the antioxidant activity of phenolic compounds was determined by the radical tests DPPH, ABTS⁺ and FRAP. Phenolic and flavonoid compounds results of *Pinus pinea* L seeds were 8.9 mg gallic acid equivalent (GAE) and 0.1 mg quercetin equivalent (EQ) / g dry matter,, respectively. The entrapment activity (IC50) against the DPPH * and ABTS + radicals ranged from to 20 and 7 g / mL. The results revealed that the administration of *Pinus pinea* L seed extract resulted in a significant decrease in serum triglycerides, total cholesterol, LDL-c and VLDL-c, which also depends on the dose administered. With regard to these results, we can say that the extract would be useful in the treatment of hyperlipidemia and the prevention of cardiovascular disease, and will find an important application in the pharmaceutical industry.

Keywords : *Pinus pinea* L, hyperlipidemia, polyphenols, triton X-100, antioxidant activity, hypolipimiant effect.

ملخص

Pinus pinea L المعروف باسم ترس الصنوبر هو صنوبرية مستوطنة في البحر الابيض المتوسط حيث تشكل بذورها جزء من نظام غذائي معترف به جيداً كحمية تقلل بعض عوامل الخطر لمتلازمة التمثيل الغذائي . وتعزى خصائصه البيولوجية إلى ثرائه في المركبات الفينولية. تم تصميم هذه الدراسة لدراسة النشاط الخافض للكوليسترول لبذور ترس الصنوبر بجرعات 200 ملغ/كغ و 400 ملغ/كغ من وزن الجسم على فئران ويستارالبيونوس ذات نسبة كولسترول عالية بعد حقن جرعة 100 ملغ/كغ من تريتون بالإضافة إلى ذلك ، تم تحديد محتويات البوليفينول والفلافونويد في هذا المستخلص وتم تحديد دراسة نشاط مضادات الأكسدة للمركبات الفينولية بواسطة اختبارات جذرية مختلفة كانت نتائج الفينول ومركبات الفلافونويد من بذور ترس الصنوبر 8.9 ملغ معادلة للاسيد غالليك/غ و 0.785 ملغ معادلة للكارسيتين على التوالي DPPH و ABTS نشاط محاصرة الجذور الحرة تراوحت بين 7 ملغ/ مل و 20 ملغ / مل . أوضحت النتائج أن إعطاء مستخلص البذور أدى إلى انخفاض كبير في الدهون الثلاثية في المصل ، الكوليسترول الكلي ، البروتين الدهني عالي الكثافة ، البروتين الدهني منخفض الكثافة البروتين الدهني منخفض الكثافة جدا الذي يعتمد أيضا على الجرعة المحددة. فيما يتعلق بهذه النتائج ، يمكننا القول أن المستخلص سيكون مفيداً في علاج فرط شحميات الدم والوقاية من أمراض القلب والأوعية الدموية ، وسيجد تطبيقاً مهماً في صناعة المستحضرات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: ترس الصنوبر ، ارتفاع الدهون ، بوليفينولة ، تريتون ، نشاط خافض للكوليسترول ، نشاط مضاد للاكسدة