

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/2019

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

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

MESBOUA Bisma & SAIDI Saadia

Thème

Etude synergique sur l'activité anti-hémolytique des protéines de deux espèces végétales Allium sativum et Pinus halepensis Mill.

Soutenu le : 07/ 07/ 2019

Devant le jury composé de :

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

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciement

*Au terme de ce modeste contribution je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères tout d'abord au « **Bon Dieu** », le tout puissant pour nous avoir donné santé, courage et patience pour terminer ce modeste travail.*

Nous tenons à remercier chaleureusement et très particulièrement notre promoteur M .CHERGUI A, de nous avoir donné l'honneur de nous encadrer et pour son aide, ses conseils précieux, son orientation et sa grande disponibilité à toute épreuve.

Nous remercions également, M.KADRI N maitre de conférence classe A, pour avoir accepté de présider le jury.

Nos sincères remerciements vont également à M. IMESSAOUDENE A maitre assistant classe A, d'avoir accepté d'examiner nos travail.

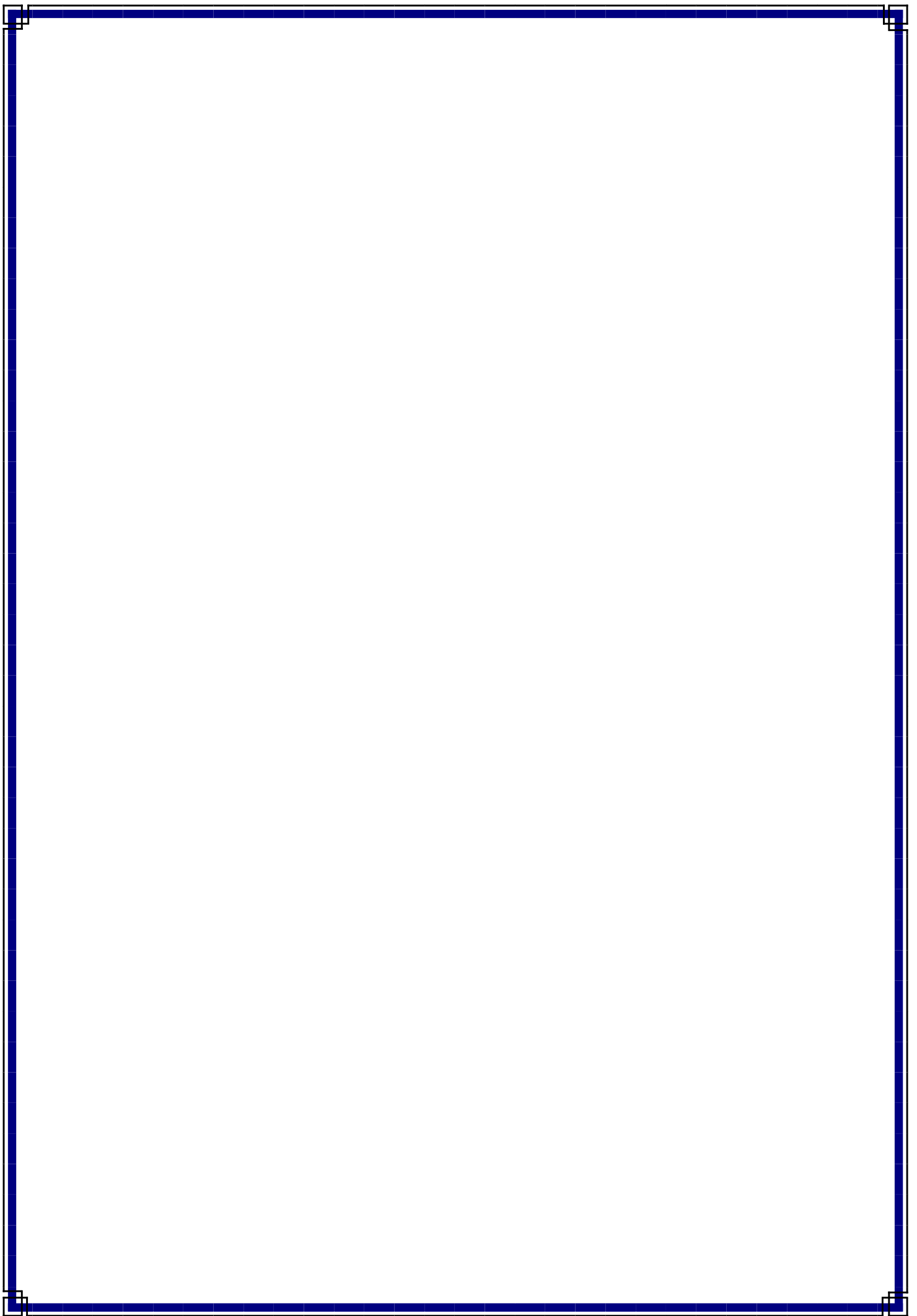
Nous remercions également le chef de département de Biologie et tous les enseignants du département pour tout le savoir qu'ils nous ont donné durant notre cursus universitaire.

Notre reconnaissance va également à tous les ingénieurs de laboratoires de Biochimie pour leurs conseils pratiques et leur disponibilité, et en particulièrement à M. Bouthaldja pour ses conseils pratiques, son aide matériels et sa disponibilité.

Sans oublier nos amies qui ont su créer un esprit d'équipe et de collaboration très bénéfique.

Nous remercions toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.





DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à celle qui ma donné à la vie, qui s'est sacrifié pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère Khadidja

A mon beau père Boudjema, qui a été mon ombre durant toutes les années des études , qui a veillé a me donner l'aide , a l'encouragement et me protéger , que dieu les gardes et les protèges

A mes sœurs : Nour el houda et son mari, Sara, Wissal et Rabab, pour leurs soutien, pour leur amour

A toute les familles Mesboua , Mokrani et Fares

A mes très chères amis : Samia, Fatima et ma binôme Saadia

A mes camarades de promotion de 2^{Eme} année master Biochimie applique (2018-2019) Sans exception.

A tous ceux qui ont contribué de près Ou de loin à la réalisation De ce travail

A tous qui m'aiment

A tous ceux qui j'aime

Je dédie ce travail

MESBOUA Besma



DEDICACE

Je dédie ce travail :

***A mon très cher père SAIDI Messaoud, je lui dédie avec fierté ce modeste travail qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'il m'a tant réservé, je suis très reconnaissante et j'aurai tant aimé partager la joie de ma réussite avec lui.*

***A ma chère mère HAOUAS Chaiaa, pour tout les sacrifices et leur soutien moral, avec toute mon affection et ma reconnaissance; merci à vous.*

***A mes frères : Ammar, Hakim et Kais: pour leurs aide et leurs amour. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de succès.*

***A mes sœurs : Naima, Laila, Saida, Karima et Faiza, pour leurs soutien, pour leur amour et soins. Vous êtes la plus belle fratrie du monde que je n'avais jamais espéré avoir.*

***A leurs enfants : Abed Allah, Abed Errahma, Souhaib, Abed Ellatif, Yaakoub, Islam, Ousama, Mahdi, Moayad Abd Elmoamin, Ayoub, Mohamed Hamza, Abed Nour, Hiba, Asma, Younes, Choayeb, et en particulièrement notre anges Maher, Abed Elwadoud, et Lina.*

***A ma grand-maman paternel : Larbaoui Aichouche et ma grand-maman maternel SAKER Hamama.*

***A toute ma famille : oncles, tantes, cousins et cousines*

***A mes très chères amis(e) : Samia, Meriem, Marwa, Randa, Yasmin, Amina, Nadjet, Fatima, Sara, Feryel, Assia, Souad, Hasna et en particulièrement à MESBOUA Besma, pour avoir grandement contribué à rendre ces années inoubliables. Vous êtes et vous resterez ma deuxième famille.*

*** Exceptionnellement à mon prof et promoteur, Monsieur CHERGUI Achour. Sachez que vous êtes, pour moi, un exemple édifiant devant me servir de référence.*

***A tous les profs qui m'ont enseignée depuis le premier palier jusqu'à ce niveau.*

SAIDI Saadia



Table des matières

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction générale..... 01

Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre I : *Allium sativum*

I.1. Origine de l'ail.....	02
I.2. Classification traditionnelle.....	02
I.3. Position systématique.....	03
• Classification classique.....	03
• Classification phylogénétique.....	03
I.4. Description botanique.....	04
I.5. Culture et conditionnement.....	05
I.6. Composition chimique et principes actifs.....	05
I.6.1. L'eau.....	06
I.6.2. Les protéines et les acides aminés.....	06
I.6.3. Les glucides.....	07
I.6.4. Les lipides.....	07
I.6.5. Les minéraux et les oligo-éléments.....	07
I.6.6. Les vitamines.....	08
I.6.7. Autres substances.....	08
I.7. Propriétés pharmacologiques et utilisations.....	08
I.8. Toxicité d' <i>Allium sativum</i>	09

Chapitre II : *Pinus halepensis* Mill

II.1. Description physique du pin.....	11
II.2. Répartition géographique.....	11
II.3. Répartition du pin d'Alep en Algérie.....	12
II.4. Position systématique.....	13
II.5. Appellations de <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	13

II.6. Origine.....	14
II.7. Description botanique.....	14
II.8. Cycle évolutif.....	15
II.9. Composition chimique.....	16
II.10. Propriétés pharmacologiques et utilisations.....	18
II.10.1. Intérêt nutritionnel et organoleptique.....	19
II.10.2. Activités biologiques.....	19
II.10.2.1. Activité antimicrobienne.....	19
II.10.2.2. Activité antifongique.....	20
II.11. Toxicité de <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	21

Partie II : Expérimentale

Chapitre III : Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels.....	22
1.1.1. Matrice végétale.....	22
A) <i>Allium sativum</i>	22
B) <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	23
1.1.2. La suspension érythrocytaire.....	24
1.1.3. Appareillage.....	24
1.2. Méthodes.....	24
1.2.1. Etude phytochimique des plantes.....	24
1.2.1.1. Préparation de l'infuse a 5 %.....	25
1.2.1.2. Test des tanins.....	25
1.2.1.3. Test des anthocyanes.....	25
1.2.1.4. Test des mucilages.....	25
1.2.1.5. Test des saponosides.....	25
1.2.1.6. Test des leucoanthocyanes.....	26
1.2.1.7. Test des dérivés anthracéniques.....	26
• Préparation de l'extrait chloroformique.....	26
• Préparation de l'hydrolysat.....	26
1.2.1.8. Test des alcaloïdes.....	26
1.2.1.9. Test des coumarines.....	27

1.2.2. Extraction des protéines totales	27
A) <i>Allium sativum</i>	28
B) <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	28
1.2.3. Précipitation des protéines par Ethanol/Acétone.....	29
1.2.4. Dosage des protéines.....	30
1.2.5. La mise en évidence de l'activité anti-hémolytique.....	30
a. Préparation des érythrocytes.....	30
b. La mise en évidence de l'activité anti-hémolytique.....	30
1.2.6. Etude synergique du mélange protéique d' <i>A.sativum</i> et de <i>P.halepensis</i>	31

Chapitre IV : Résultats et discussions

2. Résultats et discussions

2.1. Etude phytochimique des plantes.....	32
2.2. Précipitation des protéines par Ethanol/Acétone.....	34
2.3. Dosage des protéines totales.....	35
2.4. Activité anti-hémolytique sur des cellules sanguines humaines.....	36
2.5. Etude synergique du mélange protéique d' <i>A.sativum</i> et de <i>P.halepensis</i> Mill.....	36
Conclusion et perspectives	44

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

Ac	Absorbance obtenue après hémolyse totale.
Ae	Absorbance obtenue en présence de l'extrait
ASA	Allium Sativum Agglutinine
BSA	Bovin Serum Albumin, Albumine de Sérum Bovin
°C	Degré Celsius
[c]	Concentration
Ca ²⁺	Ion de calcium
Cm	Centimètre
DADS	Diallyl disulfide
DAS	Diallyl sulfures
DO	Absorbance
Fe ²⁺	Ion de fer ferré
FeCl ₃	Perchlorure ferrique ou Chlorure ferrique
g	gramme
h	heure
HCl	Acide Chlorhydrique
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
K ⁺	Ion de potassium
kDa	kilo dalton
kg	kilo gramme
KOH	Hydroxyde de potassium
m	mètre
M	Molaire
mg	milligramme
mg/ml	milligramme par millilitre
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
OH ⁻	ion hydroxyde

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pH	potentiel Hydrogène
POXs	Peroxydase
tr	tour
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
U/mg	Unité interactionnelle par milligramme
v	volume
v/v	Rapport volumique
w	watt

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Les différentes variétés de l' <i>A. sativum</i> classé selon la couleur. a) Blanc, b) Violet, c) Rouge, d) Rose	03
02	La présentation de la plante d' <i>Allium sativum</i> A ; les feuilles, B ; inflorescence, C ; bulbe d'ail, D ; les gousses d'ail	04
03	Coupe d'un bulbe d'Ail cultivé	04
04	Transformation d'alliine en allicine	06
05	La carte de répartition mondiale de genre <i>Pinus</i>	11
06	Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne	12
07	Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie	13
08	Schéma représentatif des différentes parties de <i>Pinus halepensis</i> Mill	14
09	Cycle de reproduction du pin d'Alep	16
10	Localisation de la commune Ain Bessem sur la carte d'Algérie	22
11	Localisation de la commune Ain Bessem dans la wilaya de Bouira.	22
12	Les gousses d'ail.	23
13	La poudre de l'ail.	23
14	Localisation de la commune Souk El Khemis sur la carte d'Algérie.	23
15	Localisation de la commune Souk El Khemis dans la wilaya de Bouira	23
16	Les graines de pin d'Alep	24
17	Le broyat des graines de pin d'Alep.	24
18	La poudre délipidée.	24
19	Schéma résumant le protocole d'extraction de la fraction protéique d' <i>Allium sativum</i>	28
20	Schéma résumant le protocole d'extraction de la fraction protéique de pin d'Alep	29

21	Histogramme montrant le taux protéique des graines de pin d'Alep et des gausses d'Ail	36
22	Histogramme montrant le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des extraits protéiques d' <i>Allium sativum</i> et de <i>Pinus halepensis</i> Mi	36
23	Histogramme montrant le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse du mélange protéique d' <i>Allium sativum</i> et de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	37

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Situation botanique de l'espèce <i>Allium sativum</i>	03
II	Répartition du pin d'Alep dans quelques pays méditerranéens	12
III	Situation botanique de l'espèce <i>Pinus halepensis</i> Mill	13
IV	Teneur des graines de <i>Pinus halpensis</i> Mill en lipides, en acide gras, en protéines, en sucres, en polyphénols totaux et en flavonoïdes	17
V	Teneur en minéraux des graines (mg/kg)	18
VI	Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du <i>P. halepensis</i> Mill.	20
VII	Activité antigongique de l'huile essentielle du <i>P. halepensis</i> Mill	20
VIII	Screening phytochimique de l'extrait de gousses d' <i>Allium sativum</i> et de graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill	32

INTRODUCTION

GENERALE

Les relations entre les plantes et les hommes existent depuis l'antiquité (**Din et al., 2011**). L'utilisation des plantes médicinales ou des préparations à base des plantes connaît un succès croissant. Ainsi, d'après les estimations, 80% de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle (**Ghnimi, 2015**). Une analyse des prescriptions médicales menée aux Etats unis entre 1959 et 1980 a montré que 25% d'entre elles contenaient un principe issu du règne végétale (**Farnsworth, 1988**), tandis que environ 60% de prescriptions en Europe proviennent directement ou indirectement des plantes (**Rao et al., 2004**).

Les plantes synthétisent de nombreux composés qui sont classés en fonction de leurs importances dans la viabilité de la plante dont les métabolites primaires qui sont indispensables à leurs existences, une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires. Ces derniers ont pour fonction notamment la protection contre les microorganismes, les animaux et même d'autres plantes. Ces métabolites jouent un rôle primordial dans la lutte contre diverses maladies. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme tout en se basant sur les plantes médicinales (**Hammoudi, 2015**).

L'hémolyse est le phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits après une durée de vie moyenne de 120 jours, et libèrent leur contenu hémoglobinique dans le milieu extérieur. Elle est compensée immédiatement par la moelle osseuse, sans répercussions cliniques ni biologiques (**Sébahoun, 2005 ; Faure, 2007**). De ce fait, la recherche des nouvelles substances ayant des effets anti-hémolytiques devient une nécessité majeure. Pour cela, la phytothérapie constitue une solution intéressante. Plusieurs plantes médicinales sont utilisées pour ce but telles que : l'*Allium sativum* qui fait partie de la famille des Liliacées et le *Pinus halepensis* Mill appartenant à la famille des Pinaceae. Ces deux espèces à retenu notre attention, car ils sont largement utilisés en médecine traditionnelle et qui ont montrés des effets anti-hémolytiques sur les cellules sanguines humaines.

Le présent travail est subdivisé essentiellement en deux parties : une partie bibliographique comprenant deux chapitres. Dans le premier nous avons présenté le détaille de la matrice végétale utilisée : *Allium sativum*. Le deuxième chapitre nous avons abordé les connaissances sur le *Pinus halepensis* Mill et leurs principes actifs.

La deuxième partie est consacrée à un travail expérimental où nous avons réalisé une étude phytochimique, l'extraction de la fraction protéique, et l'étude de l'activité anti-hémolytique des deux espèces étudiées sur des cellules sanguines humaines.

CHAPITRE I
Allium sativum

Chapitre I : *Allium sativum*

I.1. Origine de l'ail

L'ail, *Allium sativum*, appartient à la famille des Liliaceae. Il est aussi connu sous les noms d'ail commun ou de thériaque du pauvre ; cette famille appartient à la classe des monocotylédones. L'ail provient à l'origine d'Asie centrale (Berthet, 2014). Les premières traces de l'utilisation de l'ail remontent à plus de 5000 ans, et sont localisées au bord de la mer Caspienne, dans les plaines des pays qui la bordent à l'Est (Kazakhstan, Ouzbékistan actuels) (Krčmár, 2008 ; Senninger, 2009). Il s'est répandu progressivement en Extrême-Orient, en Arabie, en Égypte et dans le Bassin méditerranéen. Il est transporté par les marchands au gré des routes commerciales. Ce bulbe est sans doute l'un des légumes les plus anciennement cultivés par l'homme qui l'utilisait autant pour son alimentation que pour sa santé (Dufresne et Ouellet, 2010). C'est une plante médicinale par excellence. Il est sans danger pour un usage domestique et se révèle efficace pour traiter une multitude de problèmes de santé (Iserin, 2001). Il ya 2 sous-espèces, qui se plantent à des époques différentes de l'année : subsp. *ophioscorodon*, plantée en automne, et subsp. *sativum*, plantée au printemps. Les deux sous-espèces sont respectivement appelées « ail d'automne » et « ail de printemps ». Indépendamment de la couleur réelle du bulbe, l'ail dit blanc est généralement l'ail d'automne, l'ail rose est l'ail de printemps (Douaouya, 2016).

I.2. Classification traditionnelle

La classification traditionnelle de l'ail est distinguée par les cultivars selon des critères morpho-physiologiques en fonction de leurs périodes de végétation et de la couleur de la tunique du bulbe et des bulbilles (Touil *et al.*, 2015; Guemouni, 2016). L'*A. sativum* se subdivise en deux groupes, selon la capacité ou non de développer une hampe florale, et en plusieurs variétés qui diffèrent par la taille et la forme du bulbe ainsi que par la couleur de leurs enveloppes. L'ail violet (Figure 1.b) et l'ail blanc (Figure 1.a) doivent être plantés avant Décembre (pour les variétés d'hivers). L'ail rose (Figure 1.d) et l'ail rouge (Figure 1.c) sont de préférence plantés au printemps (variétés de printemps) (Arvy et Gallouin, 2003 ; Guemouni S, 2016).

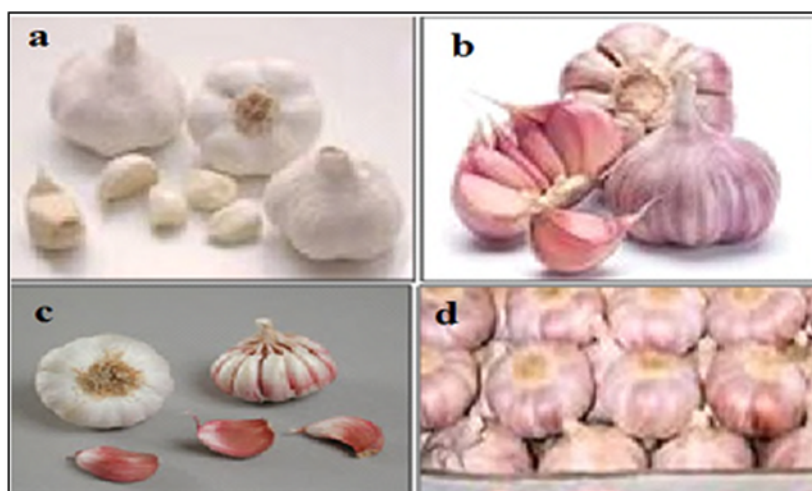


Fig 01 : Les différentes variétés de l'*A. sativum* classées selon la couleur : a) Blanc, b) Violet, c) Rouge, d) Rose (**Guemouni, 2016**).

I.3. Position systématique

Classification classique

La classification taxonomique d'*Allium sativum* est montrée dans le tableau I.

Tableau I: Situation botanique de l'espèce *Allium sativum* (**Benzeggouta 2005**).

Règne	Plantae
Sous- Règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Magnoliophytina
Classe	Liliopsida
Sous-classe	Liliidae
Ordre	Liliales (Asparagales)
Famille	Aliaceae (ex Liliaceae)
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>Allium sativum</i>

Classification phylogénétique

Ordre : Asparagales

Famille : Alliaceae

Non scientifique : *Allium sativum* (**Ghourri M, Zidane L, Douira A, 2013**).

Nom commun : Ail, ail cultivé, ail à tige tendre, thériaque des pauvres.

Nom vernaculaire arabe : thoum, ثوم (Goetz *et al.*, Teuscher *et al.*, 2005; Web Master 2, 2012 ; Moumen, 2016).

Parties utilisés : Bulbes (Ghourri M, Zidane L, Douira A, 2013).

I.4. Description botanique

Allium sativum est une espèce de plante potagère, vivace et monocotylédone (Gerges Geaga, 2015). C'est une plante pérenne herbacée, bulbeuse, et rarement bisannuelle ; atteignant 25 à 70cm de hauteur. L'ail est une espèce à nombreuse feuilles engainant le bas de la tige. L'inflorescence est enveloppée d'une spathe en une seule pièce tombant assez rapidement. Les fleurs sont groupées en ombelles assez peu nombreuses, elles sont de couleur blanche ou rose et s'épanouissent en été. Le fruit est une capsule à trois loges, mais celle-ci est rarement produite (Bruneton, 1999). La racine à bulbe est composée de trois à 20 bulbilles (gousses) arqués (les caïeux). On la récolte en juillet-août. L'odeur faible, se développe forte et soufrée dès que les tissus sont lésés (Clément, 1990).

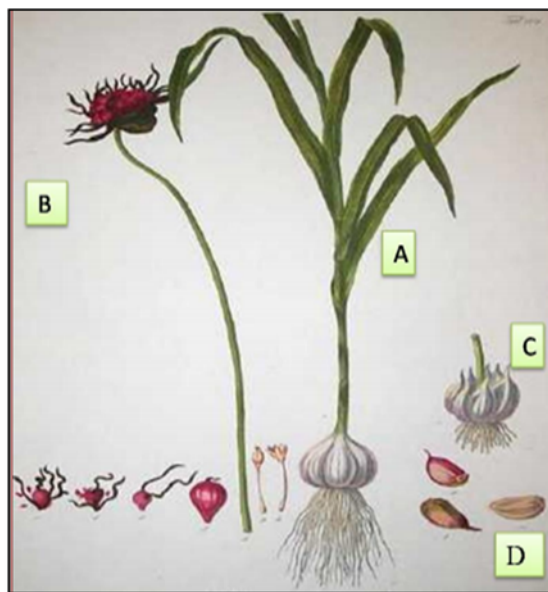


Fig 02 : La présentation de la plante d'*Allium sativum* A : les feuilles ; B : inflorescence ; C : bulbe d'ail ; D : les gousses d'ail (Goetz, *et al.*, 2012; Moumen, 2016).

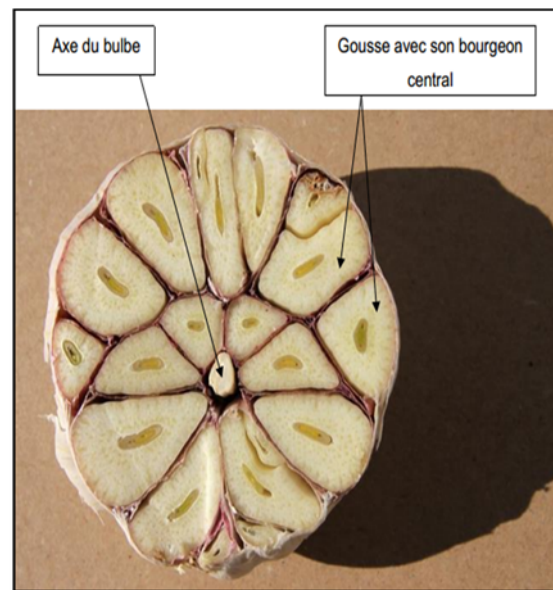


Fig 03 : Coupe transversale d'un bulbe d'*Allium sativum* (Gerbeaud, 2008 ; Dupont et Guignard, 2012 ; Colin, 2016).

I.5. Culture et conditionnement

La culture de l'ail se fait dans une large gamme de sols, mais préférablement des sols légers, bien drainés, riches en matière organique et qui possèdent une bonne capacité à retenir les éléments nutritifs ainsi que l'humidité. Les sols lourds ne sont pas recommandés puisqu'ils ont tendance à durcir lors des périodes sèches et à limiter l'expansion des bulbes qui prennent une forme irrégulière. Les sols sableux et trop légers exigent une régie de culture plus rigoureuse afin d'assurer le maintien de la fertilité des sols et l'humidité nécessaire. La grosseur des bulbes est directement liée à la croissance végétative de la plante : plus la tige sera grande et développée avant l'initiation du développement du bulbe et des gousses, plus les rendements seront élevés (**Oregon State University, 2004**).

Le pH du sol entre également en compte car l'ail est sensible à l'acidité du milieu dans lequel il pousse. Le pH optimal se situe entre 6 et 7 voire légèrement supérieur à 7 dans certaines régions (**Bachmann, 2001 ; Maurice, 2015**).

Concernant l'installation de la culture, les semences d'ail doivent être stockées sous forme de bulbe entier, si non les girofles se détériorent rapidement. Le bulbe doit être fissuré juste avant la plantation (**Si Bennasseur 2005**).

L'ail doit être séché une fois récolté. Le séchage permet une meilleure conservation en réduisant les infections fongiques ou microbiennes et diminue ainsi la perte d'humidité. Pour une utilisation destinée à la consommation de l'ail, il est important d'entreposer l'ail entre 0°C et 4°C avec une humidité comprise entre 60 et 70%. La conservation d'ail à un niveau supérieur d'humidité est à éviter, puisqu'il favorise la prolifération de la moisissure. Lorsque les conditions d'entreposage sont contrôlées, la conservation peut varier de 6 à 12 mois selon les espèces d'ail (**Hickey, 2012**).

I.6. Composition chimique et principes actifs

La composition chimique varie en fonction de la variété cultivée, du lieu de culture, du moment de la récolte, et des conditions de stockage des bulbes (**Bruneton, 2009 ; Colin, 2016**). L'ail est une source importante de composés soufrés (**Santhosha et al., 2013 ; Colin, 2016**), tel que les γ -glutamyl peptides, les trois S-alk(en)ylcystéine sulfoxydes :, l'isoalliine, la méthiine et l'alliine qui est le composé majoritaire (**Sendl, 1995 ; Colin, 2016**) et qui représente plus de 82% de la teneur totale en soufre de l'ail (**Berthet, 2014**). Les thiosulfonates (l'allicine par exemple), les ajoènes, les vinylthiines, et les sulfides (le diallyl sulfide (**Amagase, 2006; Colin, 2016**) ou le diallyl disulfide

(Sendl, 1995 ; Colin, 2016) par exemple) qui sont des produits de dégradation de l'allicine. Lorsque le bulbe d'ail est lésé (écrasé, haché, etc.) l'alliine est libéré de son compartiment et interagit avec l'alliinase (enzyme) présente dans les vacuoles adjacentes pour former l'allicine (diallyl thiosulfinate) (Guiet, 2011). La transformation de l'alliine, précurseur aromatique principal, en diverses molécules odorantes aux propriétés démontrées, est la clé de la génération de la plupart des molécules actives de l'ail. L'alliine est une substance qui est un antibiotique plus fort que la pénicilline ou la tétracycline (Majewski, 2014). En plus de ces composants soufrés trouvés dans l'huile essentielle, on trouve :

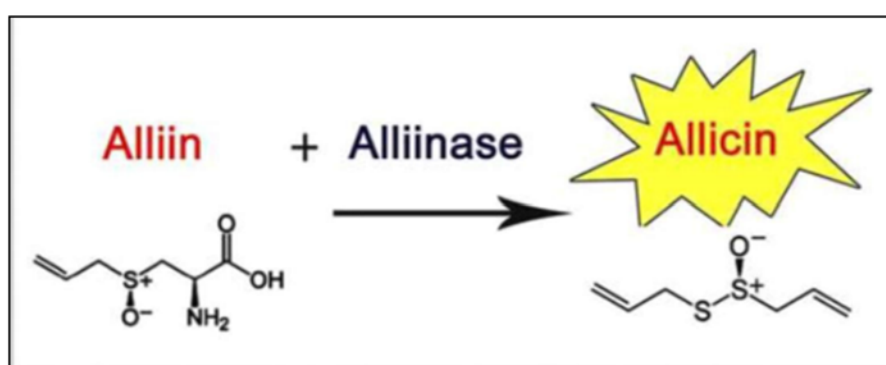


Fig 04 : Transformation de l'alliine en allicine (Raco, 2016).

I.6.1. L'eau

Un bulbe d'ail contient en moyenne 60 à 65% d'eau (Suleria *et al.*, 2015 ; Colin, 2016).

I.6.2. Les protéines et les acides aminés

L'ail est une source intéressante de méthionine et de cystéine, deux acides aminés soufrés (Amar-Costesec, Berthet, 2006; Senninger, 2009 ; Colin, 2016). En plus du tryptophane qui est le précurseur de la sérotonine (Minker, 2012 ; Colin, 2016) ; l'arginine est l'acide aminé qui est présent en plus grande quantité dans le bulbe d'ail (Sendl, 1995 ; Colin, 2016).

Les protéines représentent 6% de la composition totale d'*Allium sativum*. Les principales protéines sont les agglutinines ASA I (ASA 25) et ASA II (ASA 110) (Trudel, 2005). L'ASA I est une protéine dimère comprenant des sous-unités de lectines de 12,5 et 13,0 kDa et ASA II est une glycoprotéine de deux sous-unités identiques, elle se caractérise par une teneur élevée en acide aspartique, leucine et sérine mais une faible

teneur en méthionine et en cystéine (**Kundra, 2015**). Les deux lectines possèdent une propriété d'héماغglutination vers les lymphocytes, les thymocytes et le sang périphérique humain. En dehors de ces protéines l'agglutinine, l'alliinase (110 kDa) (Clement, Pramod, & Venkatesh, 2010), la protéine antimicrobienne alliumine (13 kDa), la protéine antifongique allivine (13 kDa), provenant de l'ail ont également été découvertes.

L'ail possède également des enzymes comme l'hexokinase, l'alliinase, la γ L glutamylpeptidase, la γ -L glutamyltranspeptidase, la lipase, la peroxydase et la polyphenoloxydase (**Ghesquiere, 2016**).

I.6.3. Les glucides

La proportion de glucides que renferme l'ail est variable selon les sources, mais elle avoisine les 30% de sa composition (**Colin, 2016 ; Senninger, 2009**). Il contient des monosaccharides (fructose, glucose), des disaccharides (saccharose, lactose), des trisaccharides (raffinose), des tétrasaccharides (tétrafructose, scorodose), des polysaccharides (l'amidon, dextrine, inuline, fructosane), et autres comme le D-galactane, Larabinose, pectines, D-fructane (**Ghesquiere, 2016**).

I.6.4. Les lipides

L'ail contient une proportion très faible voire négligeable de lipides. Il apporte de petites quantités d'acide linoléique (acide gras oméga 3) et d'acide linolénique (acide gras oméga 6), qui sont des acides gras (polyinsaturés) essentiels, que l'organisme ne peut synthétiser (**Minker, 2012**).

I.6.5. Les minéraux et les oligo-éléments

L'ail en contient une large quantité, tel que du calcium, du phosphore, du magnésium, du fer ou du sélénium. Mais l'ail est également une source d'iode, de soufre, de manganèse, de cuivre, de cobalt, de chlore, de fluor, de zinc, de sodium et de potassium (**Colin, 2016 ; Sendl, 1995; Senninger, 2009**). L'ail possède une grande quantité de sélénium contrairement aux autres légumes : Diméthylsélénide, acide méthylester méthane sulfénosélénioïque, diméthyldisélénide, bis (méthylthio) sélénide, allylméthylsélénide, acide méthylester-2-propènesulfénosélénioïque, acide propylester-1-propènesulfénosélénioïque, allylthiométhylthiosélénide (**Ghesquiere, 2016**).

I.6.6. Les vitamines

L'ail renferme de nombreuses vitamines, et notamment les vitamines : A, B1, B2, B6, C et E (Lee *et al.*, 2005), B3, B5, et B9 (Colin, 2016 ; Senninger, 2009).

I.6.7. Autres substances

Les flavonoïdes majoritaires chez l'ail sont l'apigénine et la myricétine (Colin, 2016 ; Minker, 2012). Les saponines telles que le proto-eruboside-B, et l'adénosine qui est une autre substance contenue dans l'ail. Enfin, on peut noter que l'ail renferme des phytostérols (par exemple le sitostérol), des prostaglandines, de l'acide nicotinique, des acides phénoliques (famille des polyphénols), ainsi qu'une petite quantité d'acide salicylique (100µg pour 100g de végétal cru) (Colin, 2016 ; Minker, 2012 ; Senninger, 2009 ; Suleria *et al.*, 2015).

I.7. Propriétés pharmacologiques et utilisations

Une alimentation riche en ail diminue l'agrégation plaquettaire et augmente légèrement l'activité fibrinolytique. Ces deux actions combinées confèrent à l'ail des vertus antithrombotiques ; il améliore ainsi la circulation sanguine (Gerges Geagea, 2015). Bozin et ses collaborateurs (2008) ont montré les propriétés anti-oxydantes des polyphénols extraits d'*A. sativum*. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Metwally en (2009), qui a montré que l'utilisation de l'ail permet d'augmenter le taux de croissance, diminue le taux de mortalité et augmente l'activité antioxydante chez les poissons. Par ailleurs, les travaux de Sheela et Augusti (1992) ont montré que l'ail a diminué significativement les lipides et le glucose dans le sang et l'activité de plusieurs enzymes tel que la phosphatase alcaline ; cette plante possède aussi un effet antidiabétique.

En plus, l'activité antibactérienne et antifongique des extraits d'*A. sativum* a été évaluée par l'étude de Benkeblia, (2004) ; il possède aussi des activités contre beaucoup de microorganismes qui ont été mentionnés dans les rapports cliniques depuis près de 100 ans (Cellini *et al.*, 1996). L'allicine (30µg/ml) a empêché très efficacement la croissance d'autres protozoaires parasites tels que *Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Leptomonas colosoma*, et *Crithidia fasciculata* (Ankri et Mirelman, 1999). Une autre recherche de Wargovich, (1986) a montré que le diallylsulfide, un composé aromatique d'*A. sativum*,

inhibe le diméthylhydrazine qui induit le cancer du côlon (Cantwell, 2000 ; Guemouni, 2016).

Concernant l'hypertension artérielle, l'OMS indique que l'ail peut être utile en cas d'hypertension modérée. Plusieurs essais cliniques démontrent que l'ail peut effectivement être utile (Al-Qattan *et al.*, 2016). En outre, les extraits aqueux des bulbes de l'ail, d'*Allium cepa* et de *Zingiber officinale* réduisent la glycémie chez le rat wistar rendu diabétique par l'alloxane, en comparant les trois espèces, *Allium sativum* présente la meilleure activité (Eyo, Ozougwu, Echi, 2011).

Une autre étude expérimentale ressentie a été réalisée pour évaluer l'efficacité de l'ail sur les facteurs de risque de la maladie cœur coronaire, pour cette raison, un extrait alcoolique d'*Allium sativum* a été administré par voie orale à un groupe de lapins albinos pour deux semaines. Les résultats de cette étude ont montré que l'ail possède un agent anti-coagulant à court terme significatif et actions thrombolytiques (Singh, Chaturvedi, 2015).

Dans certaines études, l'allicine a été proposée comme étant le principal composé actif associé à l'effet cardioprotecteur de l'ail, par sa capacité de réduire les plaques d'athérosclérose chez l'animal (Gouen, Harats, 2005) ; ainsi que l'ajoène est un composé capable d'empêcher la synthèse du cholestérol *in vitro* (Jakubowski, 2003) ; et pourrait ainsi jouer un rôle dans l'effet hypocholestérolémiant attribué de l'ail.

De nombreux essais *in vitro* et sur des animaux indiquent que les composés sulfurés de l'ail peuvent avoir un effet anticancer (Nagini, 2008 ; Seki *et al.*, 2008). Il augmente le taux de combativité du système immunitaire pour le protéger notamment contre certains types de cancer comme celui de l'estomac, du colon et de la peau (Lu *et al.*, 2004). Le diallyl disulfide (DADS) peut inhiber la croissance des cellules du cancer du sein (Nakagawa *et al.*, 2001). Le mécanisme de la suppression du cancer entraîne la mort cellulaire par apoptose et diminution du taux de la prolifération cellulaire (Nakagawa *et al.*, 2001). L'ajoène pourrait contribuer à l'apoptose (Hassan *et al.*, 2004). Le S-allylcysteine est un agent antitumoral par son effet régulateur sur la différenciation, l'invasion de la tumeur et la migration vers les métastases (Balasenthil *et al.*, 2003).

I.8. Toxicité d'*Allium sativum*

Les effets de l'ail pourraient potentiellement s'ajouter à ceux d'autres plantes (Berthet, 2014). Sa consommation entraîne une odeur forte de l'haleine et de la peau, reconnaissable et persistante (Amagase *et al.*, 2001 ; Anton, Wichtl, 2003 ; Jung, 2005). La consommation de bulbe frais, d'extraits ou d'essence est à l'origine de manifestations

digestives (nausées, vomissements, diarrhées...). L'ail cru et la poudre peuvent diminuer le taux plasmatique des protéines et du calcium. Ils peuvent être à l'origine d'anémies et d'une inhibition de la spermatogénèse. L'alliine est un des plus irritants et le diallyl sulfures (DAS) est le plus allergène (**Amagase *et al.*, 2001; Jung, 2005**). On peut retrouver des manifestations allergiques : dermatites de contact, crise d'asthme sévère suite à l'inhalation de poudre d'ail. (**Anton, Wichtl, 2003 ; Jung, 2005**).

CHAPITRE II

***Pinus halepensis* Mill**

Chapitre II : *Pinus halepensis* Mill

II.1. Description physique du pin

Les pins sont des arbres de la famille des pinacées et du genre *Pinus*. Ils sont largement distribués dans les zones tempérées de l'hémisphère. Cette famille comprend environ 250 espèces (Fekih *et al.*, 2014) qui poussent dans des habitats très variés, du niveau de la mer à des altitudes de 4000m. On les distingue des autres membres de la famille par leurs feuilles, qui sont des aiguilles dont la longueur varie entre 4 et 20 cm. Ils sont disposés en faisceaux. Chaque faisceau comprend un nombre d'aiguilles particulier d'après lequel on divise les espèces en deux groupes : les espèces dont les aiguilles sont groupées par deux ou rarement, par trois et les espèces dont les aiguilles sont groupées par cinq. Les fruits sont des cônes de longueur variable entre 3 et 21 cm qui contiennent des graines. Ces arbres, dont la hauteur peut atteindre 40m, ont une longévité importante (Farjon, 2005). La carte présentée à la figure 05 illustre la distribution du pin sur la terre.

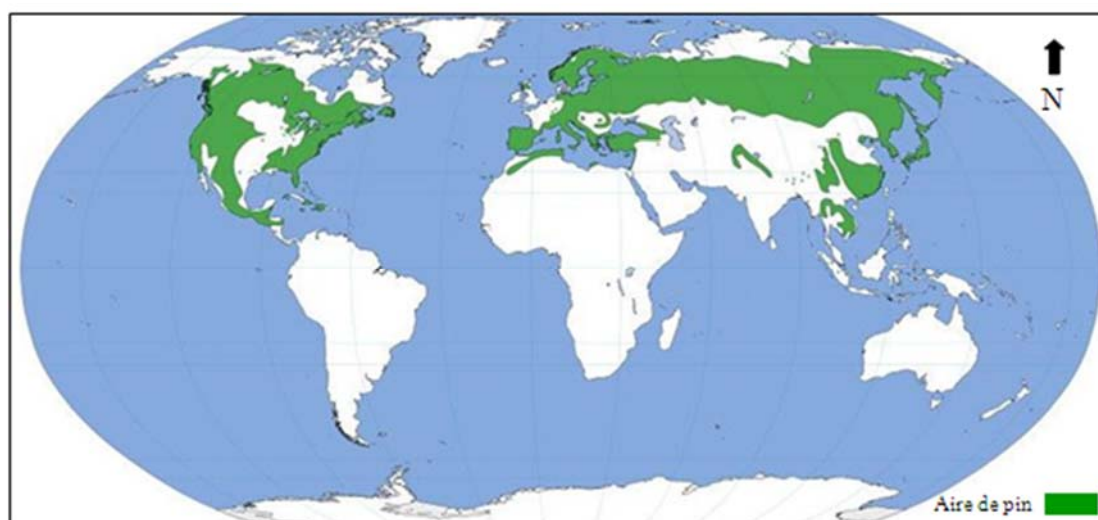


Figure 05 : la carte de répartition mondiale de genre *Pinus* (Site de web).

II.2. Répartition géographique

L'aire de répartition du pin d'Alep est limitée au bassin méditerranéen et occupe plus de 3,5 millions d'hectares (Quezel, 2003). Cette espèce est surtout cantonnée dans les pays du Maghreb et en Espagne où elle trouve son optimum de croissance et de développement comme la figure 06 et le tableau II indiquent (Bentouati, 2006).

Tableau II: Répartition du pin d'Alep dans quelques pays méditerranéens (**Bentouati, 2006**).

Pays	Superficie (ha)	Source
Algérie	800.000	Mezali (2003)
Maroc	65.000	Bakhiyi (2000)
Tunisie	297 000	Sghaier (2005)
France	244 000	Michel V (2010)
Espagne	1.046.978	Montéro (2000)
Italie	20.000	Seigue (1986)
Grèce	330.000	Seigue (1986)

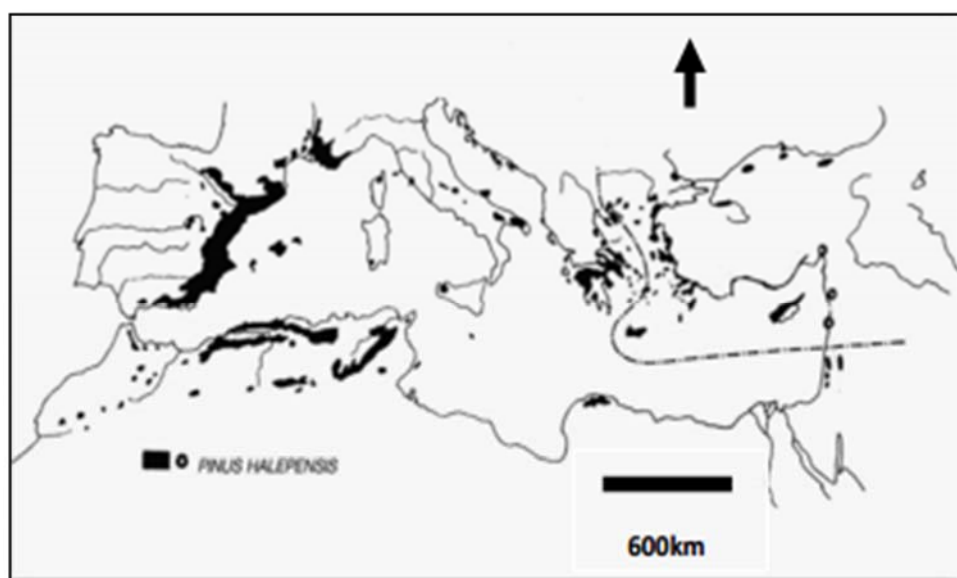


Figure 06 : Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne (**Quezel, 1986**).

II.3. Répartition du pin d'Alep en Algérie

En Algérie, il occupe 35 % de la surface boisée (Fig.07). Il forme des peuplements dans la région de Tébessa, les plateaux constantinois et les Aurès, la région d'Alger (forêts de Médéa), à Bel Abbes, à Saida et dans l'Ouarsenis, l'atlas saharien et dans la région de Djelfa, les monts des Ouled-Nail (**Bentouati, 2006**).

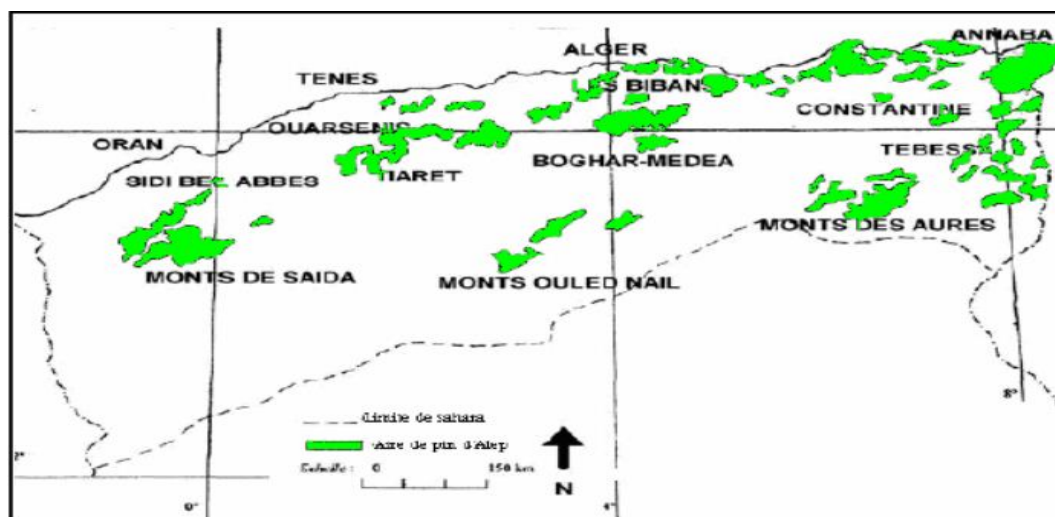


Figure 07 : Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie (Seigue, 1985).

II.4. Position systématique

Pinus halepensis Mill, nom scientifique donné par Philip Miller en 1768 puis Duhamel a ensuite décrit le pin d'Alep sous le nom de *Pinus hierosolimitana* en 1755 (Nahal, 1962). Il est classé comme le montre le tableau III.

Tableau III : Situation botanique de l'espèce *Pinus halepensis* Mill (Ozenda, 2006).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Coniferales
Famille	Pinaceae
Sous-famille	Pinoideae
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis</i> Mill

II.5. Appellations de *Pinus halepensis* Mill (Ozenda, 2006)

- Français : Pin blanc, Pin d'Alep, Pin de Jérusalem ;
- Arabe : Sanawbar el halabi;

- Espagnol : Pi blanc, Pi bord, Pincarrasco, Pinoblanquillo ;
- Italien : Pino di Aleppo ;
- Berbère: Azenba, Zgigo.

II.6. Origine

Cet arbre est commun pour l'Afrique du Nord, l'Espagne et l'Italie. On le trouve aussi en Palestine, en Jordanie, au Liban, en Syrie, en Turquie, en Grèce et en France dans la région méditerranéenne (Sghaier, 2005).

I.7. Description botanique

Le houppier de cette espèce est clair, souvent en forme de parasol. Son tronc est tortueux. Son écorce, de couleur gris argent, se fissure avec l'âge. Sa longévité est estimée à 150 ans avec une moyenne de 100 à 120 ans (Kadik, 1984). Ses aiguilles mesurent de 6 à 10 cm de longueur et sont groupées par deux en pinceaux à l'extrémité des rameaux. Ses fleurs mâles et femelles sont séparées, mais sont situées sur le même sujet, toujours groupées en épis. Ses fruits sont des cônes pendants de 8 à 12 cm de longueur, persistant pendant plusieurs années sur les rameaux. Ses graines abondantes, d'environ 5 mm de longueur, possèdent une grande aile persistante qui permet une dissémination rapide et éloignée (Farjon, 2005) ; cette description est résumée dans la figure 08.



Figure 08: Schéma représentatif des différentes parties de *Pinus halepensis* Mill (Taibi *et al.*, 2017).

II.8. Cycle évolutif

Le pin d'Alep se reproduit en général vers l'âge de 8-12 ans (**Boudy, 1950 ; Nahal, 1962**). Cependant la maturité sexuelle peut être plus précoce vers 4 ans (**Bellefontaine, 1979**) Le pin d'Alep est une espèce monoïque ; les organes sexuels mâles et femelles sont nettement séparés dans l'architecture de l'arbre (**Chokri, 2005**). Les inflorescences mâles sont composées par des petits chatons jaunâtres groupés en épis. Tandis que, les inflorescences femelles sont composées par des cônes ovoïdes, montés sur un court pédoncule oblique avec des écailles épaisses à écusson peu saillant brun verdâtre ou rouge lustré (**Mouilah, 1988**). En Algérie, la longueur des cônes varie entre 66 et 85 mm, et la largeur de 20 à 38 mm (**Kadik, 1984**). C'est une espèce diploïde qui compte 24 chromosomes (2n), comme c'est le cas pour la plupart des pins (**Mirko, 1991**).

Le cycle évolutif peut se résumer à trois phases comme la montre la figure 07 (**Dilem, 1992**):

- Floraison : à lieu en février, l'abondance varie suivant les stations et les années. On remarque qu'il y a un écart entre la réception du pollen par les fleurs et leurs fécondations.
- Fructification : le pin d'Alep fructifie à partir de 12 à 15ans mais la fertilité des graines n'est assurée qu'à partir de 18 à 20ans et elle est généralement bisannuelle, les graines s'échappent du cône durant la 3eme année d'apparition de celui-ci.
- Débourrement : la période de démarrage est de très courte durée. La phase de la croissance active s'étend sur six mois environ (mi-janvier à mi-juillet), le palier marquant la fin de la croissance est obtenu tardivement (au mois de septembre). L'arrêt de la végétation est de très courte durée, puisqu'au début du mois d'octobre, certains rameaux croissent encore et qu'à la fin du même mois apparaît un bourgeon terminal de taille d'ailleurs fort réduit (**Poupon, 1970**).

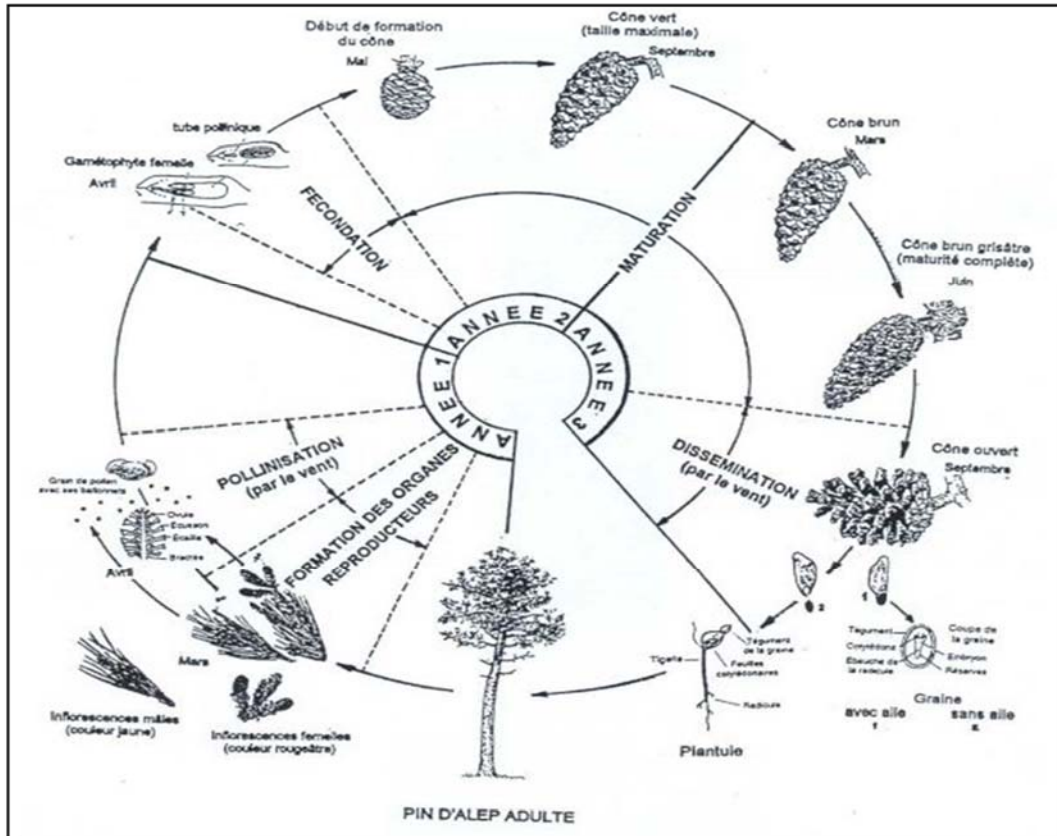


Figure 09: Cycle de reproduction du pin d'Alep (Chokri, 2005).

II.9. Composition chimique

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de pin ont fait d'objet de plusieurs études phytochimiques dans le but d'identifier ses principes actifs. Ces études ont révélées que ces graines sont riches en plusieurs constituants hétérogènes tels que les lipides, les protéines, les sucres, et les composés phénoliques, dont la teneur peut varier d'une espèce à une autre selon les conditions géographiques et climatiques ; comme le montre le tableau IV (Medjdoub *et al.*, 2017).

Tableau IV: Teneur des graines de *Pinus halepensis* Mill en lipides, en acide gras, en protéines, en sucres, en polyphénols totaux et en flavonoïdes (**Cheikh-rouhou et al., 2007; kadri et al., 2014**).

Teneur des graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill	
Taux des lipides en %	43.3
Taux en acide gras (g/100g)	Acide oléique : 27.3
	Acide linoléique : 48.8
	Acide palmitique : 8.75
Taux en protéines en %	26.62
Taux en sucres en %	5.55
Taux en phénols totaux (mg/g)	3.71
Taux en flavonoïdes (mg/g)	2.17

Les graines de pins sont des graines oléagineuses riches en huile (**Tillman-Sutela et al., 1995**), ce dernier est plein en vitamines essentielles ainsi qu'en macroéléments qui ont un pouvoir nutritif. Comme vitamines on peut citer : E ; F, connues pour leur haut niveau physiologique et propriétés antiacides, B1; B2 ; B3; vitamine pro A (bêta-carotène) et d'autre caroténoïdes (**Kadri, 2012**).

Dans cette huile il y a aussi des micros éléments comme le magnésium; zinc; fer; cuivre; iode; calcium; phosphore; manganèse; cobalt et une grande quantité des acides gras polyinsaturé. Ces éléments, qui ont un effet bénéfique pour la santé, sont fortement présents dans les graines du *Pinus halepensis*, (**Rouhou et al., 2006**), comme le montre le tableau V. L'huile de pin contient également jusqu'à 5% de substances azotés, dont 90% sont les acides aminés, parmi lesquels 70% sont des aminoacides essentiels (**Kissileff et al., 2003**).

Tableau V : Teneur en minéraux des graines (mg/kg), (Cheikh-rouhou *et al.*, 2007)

Elément	<i>Pinus halepensis</i> Mill
potassium	6171 ± 12.0
Magnésium	3303 ± 9.8
Calcium	1167 ± 4.9
Phosphore	568 ± 0.8
Sodium	69.6 ± 0.1
Fer	271 ± 1.8
Cuivre	22.5 ± 0.1
Zinc	134.9 ± 0.4
Manganèse	51.3 ± 0.1

Les composés phénoliques de pin constituent un large groupe de composés métaboliques qui possèdent plusieurs fonctions phénols, leur structure est plus ou moins complexe avec un poids moléculaire qui peut atteindre 30 KDa (**Bravo, 1998**).

II.10. Propriétés pharmacologiques et utilisations

Pinus halepensis Mill est l'espèce forestière la plus importante dans de nombreux pays méditerranéens. Il a une grande valeur économique, écologique et sociale (**Khouja 1997**). Il est utilisé généralement dans des programmes de reboisement des sols dégradés (**Maestre et Cortina, 2004**), cas de la «ceinture verte» dans le Sud de l'Algérie, où 1 million de hectares ont été plantés de pins d'Alep il y a plus de 20 ans (**Lahouati, 2000**).

Son bois est utilisé en construction, industrie, menuiserie, bois et pâte à papier, pour l'étagage des mines, la construction navale et la charpenterie (**Maestre, F et al., (2004)**).

Le pin utilisé aussi dans le domaine cosmétique expliqué par sa richesse en acide gras, vitamine E, polyphénols et antioxydants naturelles. Elles sont aussi utilisées dans le domaine agroalimentaire (la pâtisserie) (**Colonel et al., 2011**).

Plusieurs études indiquent que les métabolites des espèces de genre *pinus* présentent divers activités biologiques. Ces travaux qui ont été réalisé dans ce contexte, concernent les graines qui présentent des activités antioxydantes et anti inflammatoires qui sont en générales associé à la présence des polyphénols et des flavonoïdes. Les extrais des aiguilles notamment les huiles essentiels, ont montrés une activité anti bactérienne, anti

inflammatoire et anti cancéreuse. Ainsi l'écorce possède une activité anti inflammatoire et antioxydante (**Medjdoub et al., 2017**).

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 (**Lucienne, 2010**).

L'huile de pin est utilisée en aromathérapie dans les massages de la peau ; dans la cuisine (comme ingrédient pour les soupes, vinaigre,...), dans le soulagement de problèmes gastro-intestinaux comme les ulcères de l'estomac. Cette huile se comporte également comme un inhibiteur de l'appétit, un stimulant de l'absorption des protéines, ainsi comme un produit naturel dans le traitement des maladies cardio-vasculaires parce qu'elle contient de l'acide pinolénique qui régule le taux des lipides totaux du sang, en réduisant la consolidation des plaquettes, ce qui aboutit à une diminution de la pression sanguine. Aussi elle contient des antioxydants qui sont bénéfiques à l'organisme tout en entier (**Kissileff et al., 2003 ; Woods, (2004); Kadari, 2012**).

Le gemmage du pin d'Alep n'est plus pratiqué actuellement. Pourtant c'est l'espèce la plus productive de résine (1 à 4 kg / arbre / an), et elle donne une essence de térébenthine très appréciée (**Bobbou, 2016**).

II.10.1. Intérêt nutritionnel et organoleptique

Les protéines de pin d'Alep sont constituent l'apport énergétique essentiel, de même que les corps gras qui fournissent environ deux fois plus de calories que les glucides. En plus de leur rôle nutritionnel, les corps gras ont un intérêt organoleptique non négligeable. En effet, ils contribuent par leur utilisation culinaire, à la sapidité des aliments ainsi qu'à leurs textures. Donc les corps gras rencontrés dans l'huile de pins peuvent fournir les mêmes effets dans le domaine agroalimentaire (**Kadari, 2012**).

II.10.2. Activités biologiques

II.10.2.1. Activité antimicrobienne

L'huile essentielle de *P. halepensis* Mill provenant de l'ouest d'Algérie a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque contre 11 bactéries. Les tests ont montré

que l'huile a une activité antibactérienne variable contre les souches testées. La zone maximale d'inhibition a été enregistrée contre les cinq souches mentionnées ci-dessous (tableau VI) (Macchioni *et al.*, 2002) :

Tableau VI : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *P. halepensis* Mill (Macchioni *et al.*, 2002).

Micro-organismes	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	9.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	10.0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9.5
<i>Citrobacter freundii</i>	8.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.0

L'huile essentielle de *P. halepensis* extraite à partir des aiguilles montre une activité antifongique contre les champignons suivants : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger* ; *Fusariumoxysporum* ; *Rhizopusstolonifer* (Fekih *et al.*, 2014).

II.10.2.2. Activité antifongique

L'huile essentielle de *P. halepensis* Mill extraite à partir des aiguilles montre une activité antifongique contre les champignons suivants (Fekih *et al.*, 2014) :

Tableau VII : Activité antifongique de l'huile essentielle du *P. halepensis* Mill (Abi-Ayad *et al.*, 2011).

Champignons	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus flavus</i>	3
<i>Aspergillus Niger</i>	3.75
<i>Fusariumoxysporum</i>	9
<i>Rhizopusstolonifer</i>	3.5

II.11. Toxicité de *Pinus halepensis* Mill

Les huiles essentielles contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses. De plus, certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques (**J.M. Meynadier *et al.*, 1997**).

Il a été rapporté qu'en présence de parfums, les personnes asthmatiques et développant des allergies de contact présentent des détresses respiratoires plus fréquemment que les personnes saines. Cependant, les mécanismes immunologiques n'ont pas été démontrés (**Elberling J, Skov P.S, 2007**).

CHAPITRE III
MATERIELS ET
METHODES

1. Matériels et méthodes

L'objectif de cette étude est la détermination du taux de protéines dans les extraits de graines de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill) et de gousses d'Ail (*Allium sativum*). Ainsi que la recherche de leurs activités anti hémolytique. La partie expérimentale de cette étude est réalisée comme suit :

- ✓ Analyse phytochimique d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill.
- ✓ L'extraction et le dosage des protéines totales des deux plantes étudiées.
- ✓ Etude de l'activité anti hémolytique des extraits de ces plantes.

1.1. Matériels

1.1.1. Matrice végétale

A) *Allium sativum*

La matière végétale utilisée dans notre étude est: l'*Allium sativum* qui est une plante médicinale (légume), récoltée dans un jardin à Ain Bessem (wilaya de Bouira) (figure 10 et 11) durant le mois d'Aout 2018, lorsque ses feuilles sont totalement fanées, les bulbes semblent bien formés et en pleine maturité avec une couleur rose, odeur et un gout fort. Le stockage est effectué dans un endroit sec et à l'abri des rayons du soleil. Les parties qui font l'objet de cette recherche sont les gousses de l'ail frais qui ont été utilisé dans l'extraction des protéines totales ; tandis que la poudre a été utilisé dans l'analyse phytochimique. (figure 12 et 13).



Figure 10: Localisation de la commune Ain Bessem sur la carte d'Algérie.



Figure 11: Localisation de la commune Ain Bessem dans la wilaya de Bouira.



Figure 12: Les gousses d'ail.



Figure 13: La poudre de l'ail.

B) *Pinus halepensis* Mill

Le pin que nous avons utilisé dans cette étude est celui de la catégorie *Pinus halepensis* Mill, qui appartient à la famille des pinacées. C'est est une plante médicinale, récoltée dans un jardin à Souk El Khemis (wilaya de Bouira) (figure 14 et 15) durant le mois de Janvier 2019, les cônes semblent bien formées et mature avec une couleur marron. Le stockage est effectué dans un endroit sec et à l'abri des rayons du soleil. Les parties utilisées dans cette recherche sont les graines de pin d'Alep pour l'analyse phytochimique et la poudre délipidée pour l'extraction des protéines totales (figure 16, 17, et 18).



Figure 14: Localisation de la commune Souk El Khemis sur la carte d'Algérie.



Figure 15: Localisation de la commune Souk El Khemis dans la wilaya de Bouira.



Figure 16: Les graines de pin d'Alep.



Figure 17: Le broyat des graines de pin d'Alep.



Figure 18 : La poudre délipidée.

1.1.2. La suspension érythrocytaire

Le sang utilisé pour préparer les suspensions érythrocytaires a été prélevé à partir des personnes saines et récupéré de l'hôpital Mohammed Boudiaf dans des tubes héparines auxquels des analyses sérologiques ont été faites, et cela à fin d'exclure tout risque de contamination d'une quelconque pathologie.

1.1.3. Appareillage

- Spectrophotomètre UV-Visible : Optizen -322OUV
- Congélateur domestique : Condor-BH4JE.
- Balance électronique de précision 0,001g : OHAUS, et KERN de précision 0.01g avec un maximum de 400 g.
- Bain ultrasonore en mode indirect : J.P.SELECTA, s.a –Autovia A2.
- Etuve réglable : Venticell.
- Centrifugeuse EZ Swing -3K (3000 tr/ min).
- Agitateur magnétique : Hot plate stirrer.
- Bain marie : niive bath –NB20.
- PH-mètre : METTLER TOLEDO -Five Easy F20

1.2. Méthodes

1.2.1. Etude phytochimique des plantes

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les poudres préalablement préparés des deux plantes étudiées en milieu aqueux par infusion.

Le principe des tests phytochimiques est soit basé sur la formation des complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation des complexes colorés en utilisant des réactions de coloration.

1.2.1.1. Préparation de l'infuse à 5 %

Nous avons introduit 5 g de la poudre séchée de la plante dans 100 ml d'eau distillée bouillante pendant 30 min puis nous avons filtré la solution. Il faut laver la poudre avec de l'eau distillée chaude afin d'arriver au volume 100 ml (**Beddou, 2015**).

1.2.1.2. Recherche des tanins

À 5 ml d'infuse, nous avons rajouté quelques gouttes d'une solution de $FeCl_3$ à 5 % la réaction donne une coloration bleu noir en présence des tanins (**Trease et Evans, 1987**).

1.2.1.3. Recherche des anthocyanes

Nous avons rajouté quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré à 5 ml d'infuse à 5 %. La réaction donne une coloration rouge en présence d'anthocyanes (**Mibindzou Mouellet, 2004**).

1.2.1.4. Recherche des mucilages

Nous avons introduit 1 ml d'infuse dans un tube et on lui ajoute 5 ml d'éthanol absolu, obtention d'une précipitation des flocons indique la présence des mucilages (**Mentha Spicata, 2006**).

1.2.1.5. Recherche des saponosides

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse, leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux après l'agitation, et nous avons laissés se mélanger pendant 20 minutes

- Pas de mousse : test négatif.
- Mousse moins de 1cm : test faiblement positif.
- Mousse de 1 à 2 cm : test positif.
- Mousse plus de 2 cm : test très positif (**Trease et Evans, 1987**).

1.2.1.6. Recherche des leucoanthocyanes

Les leucoanthocyanidines sont des composés organiques incolores de la famille des flavonoïdes proches des anthocyanidines et des anthocyanes (Heller *et al.*, 1985).

Selon le protocole de Diallo, 2000 (modifié) ; nous avons mis 2 g de la poudre végétale dans 20 ml d'un mélange de propanol/acide chlorhydrique concentré (1/1 ; v/v) puis nous avons portés en bain marie bouillant pendant quelques minutes. Une coloration rouge se développe en présence des leucoanthocyanes.

1.2.1.7. Recherche des dérivés anthracéniques

- Préparation de l'extrait chloroformique

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 g de poudre végétale dans 10 ml de chloroforme, ensuite nous avons procédé à un chauffage au bain marie pendant 15 min puis nous avons filtré et complétés le volume à 10 ml avec du chloroforme (Diallo, 2000).

- Préparation de l'hydrolysat

Le résidu épuisé par le chloroforme est additionné de 10 ml d'HCl concentré, après un chauffage au bain marie bouillant pendant 15 min, nous avons refroidi la solution sous un courant d'eau la filtré. Le filtrat a été ajouté à 10 ml avec de l'eau distillée (Diallo, 2000).

A l'extrait chloroformique nous avons ajouté une solution aqueuse de KOH à 10 % (Annexe 2), après agitation, la présence des anthraquinones a été confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge (Diallo, 2000).

1.2.1.8. Recherche des alcaloïdes

Nous avons introduit 1 g du matériel végétal dans 5 ml d'une solution d'acide sulfurique à 10 % (Annexe 3). Le mélange obtenu a été mis sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Ce mélange a été ensuite filtré et le volume a été complété avec de l'eau distillée à 5 ml. 1 ml du filtrat obtenu a été placé dans un tube et 5 gouttes de réactif de Dragendorff (Annexe 4) ont été ajoutées. L'apparition d'un précipité rouge orange dans le tube témoigne de la présence des alcaloïdes (Soro *et al.*, 2009).

1.2.1.9. Recherche des coumarines

Nous avons mis 2 g de poudre végétale à ébullition dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min dans un bain marie puis filtrer. A 5 ml de filtrat, nous avons rajouté 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH (Annexe 5) et quelques gouttes d'HCl à 10 % (Annexe 6), la formation d'un trouble indique la présence des coumarines (**Diallo, 2000**).

1.2.2. Extraction des protéines totales

L'obtention de l'extrait protéique brut des deux échantillons a été réalisé selon le protocole de (**Clement, Pramod, & Venkatesh, 2010; Kimbaris et al., 2006**) modifié.

A) *Allium sativum*

L'optimisation des conditions optimales de travail a été effectuée selon **Desire, 2011**. Les paramètres physico-chimiques utilisés pour l'extraction des protéines totales d'*Allium sativum* sont : le pH, la température d'incubation et le temps de macération. Le taux de protéines optimal été possible avec le procédé d'extraction adopté dans ce travail, en utilisant les paramètres suivant et qui sont décrits précédemment:

- PH d'extraction égale à 6,22.
- Un temps de macération proche à 1h 42 min.
- Une température de 24,53 °C.

L'obtention de l'extrait protéique a été effectuée selon le schéma de la figure suivante :

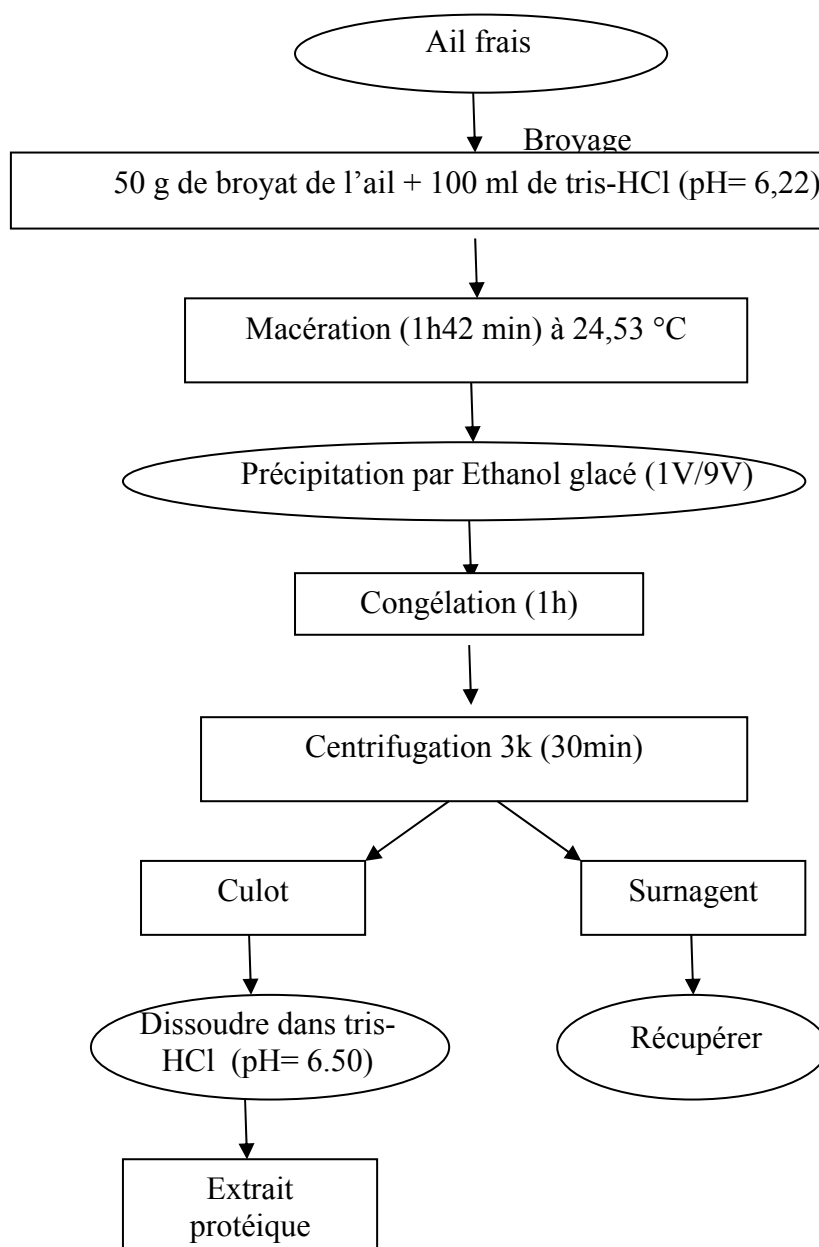


Figure 19: Schéma résumant le protocole d'extraction de la fraction protéique d'*Allium sativum*.

Le broyat de l'ail frais (50 g) a été macéré dans 100 ml de tampon tris-HCl de 0,1 M (Annexe 7) pendant 1h42 à une température de 24 ,53 et un pH de 6,22 puis une étape de filtration a été réalisée sur papier Whatman dans le but de l'élimination des débris cellulaires.

B) *Pinus halepensis* Mill

L'obtention de l'extrait protéique du pin d'Alep a été effectuée selon le schéma de la figure suivante :

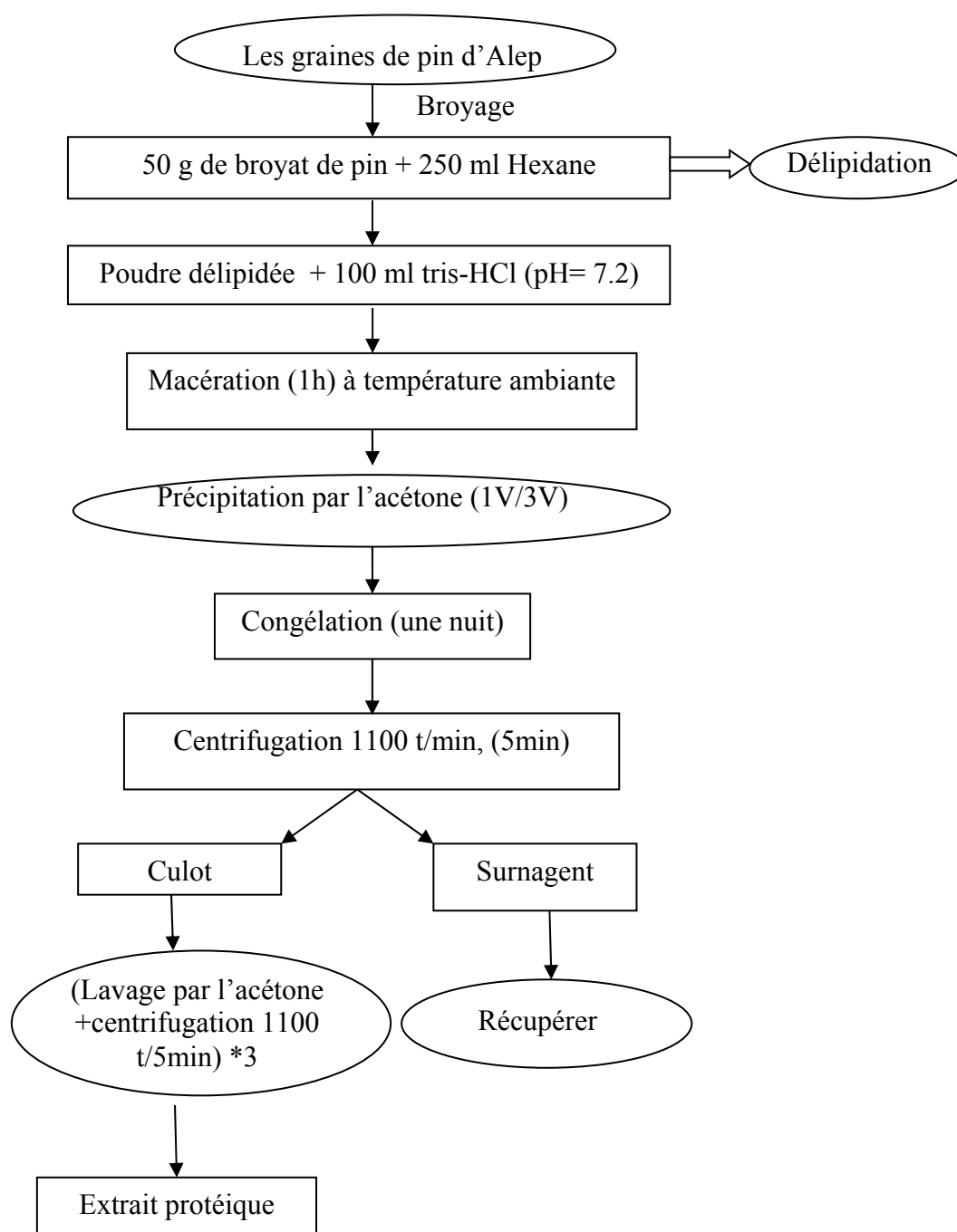


Figure 20 : Schéma résumant le protocole d'extraction de la fraction protéique de pin d'Alep.

Le broyat de pin d'Alep (50 g) a été mélangé avec 250 ml d'hexane pendant 4h à température ambiante ; puis une étape de filtration a été réalisée par papier Whatman. La poudre délipidée a été mise dans le tris-HCl de 0.1 M (pH de 7,2).

1.2.3. Précipitation des protéines par Ethanol/Acétone

Il existe plusieurs techniques de précipitation des protéines, qui reposent sur les variations de solubilité des protéines en fonction du solvant ou du pH. Il est également possible de réaliser la précipitation par les solvants organiques (éthanol, acétone) (**Briande et al., 2019**).

1.2.4. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**). En utilisant le Bleu de Coomassie et le sérum albumine bovine (BSA) comme standard (Annexe 8 et 9) (**Hijazi, M, 2011**). C'est une technique basée sur le changement d'absorbance qui se manifeste par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (compléxation) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines (**Bradford, 1976**).

1.2.5. La mise en évidence de l'activité anti-hémolytique

a. Préparation des érythrocytes

La suspension érythrocytaire a été préparée selon le protocole de (**Alinezhad et al., 2012; Ebrahimzadeh, Nabavi, & Eslami, 2010**). Le sang hépariné a été centrifugé à 1500 tr/min pendant 10 min à 4 °C. Le plasma et les couches de globules blancs ont été aspirés et éliminés. Les érythrocytes contenus dans le culot ont été repris dans le tampon tris-HCl (à 0,1 M et pH 7,4) à 10 volumes. Après mélange par retournement, les échantillons ont été à nouveau centrifugés à 1500 tr/min pendant 10 min à 4 °C et les surnageant ont été éliminés à l'aide d'une micropipette. Le lavage du culot a été répété 3 fois dans les mêmes conditions. Les érythrocytes lavés ont été suspendus dans le tris-HCl (1 /1), (v/v), puis conservés pendant 2 à 4 jours à 4 °C.

b. La mise en évidence de l'activité anti-hémolytique

La suspension érythrocytaire à 4 % a été préparée dans le tris-HCl de 0,1 M et un pH de 7,4. 2 ml de cette suspension ont été ajoutés à 0,5 ml de chaque concentration d'extrait protéique à tester déjà préparés dans le tris-HCl (24 -12-6-1-0,5 et 0,25 mg/ml). Puis, le milieu a été dilué en le complétant avec le tris-HCl jusqu'à 5 ml dans chaque tube à essai. Le mélange

obtenu a été incubé pendant 5 min à température ambiante. 0,5 ml de H₂O₂ à 1M (Annexe 10) préparés dans du tris-HCl ont été ajoutés pour induire la peroxydation des lipides membranaires des érythrocytes. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 2h dans un bain marie à 37° C.

Ensuite, les échantillons ont subi une centrifugation à 1000 tr /min pendant 10 min. Enfin, les surnageant obtenus dans chaque tube ont été aspirés et les lectures des DO ont été réalisées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Un contrôle contenant 2 ml de suspension érythrocytaire à 4 % a été incubé avec 2 ml de H₂O₂ pour avoir une hémolyse totale (100 %) (Nabavi *et al.*, 2013; Naim, Gestetner, Bondi, & Yehudith 1975).

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

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

Dont :

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

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

1.2.6. Etude synergique du mélange protéique d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill.

La suspension érythrocytaire à 4 % a été préparée dans le tris-HCl de 0,1 M et un pH de 7,4. 2 ml de cette suspension ont été ajoutés à 0.5 ml de la concentration 0.5 mg/ml de différent pourcentage (25% de pin d'Alep/ 75% d'Ail, 50% de pin d'Alep / 50% d'Ail et 75% de pin d'Alep / 25% d'Ail). Puis nous avons complété avec les mêmes étapes cités précédemment.

CHAPITRE IV
RESULTATS ET
DISCUSSIONS

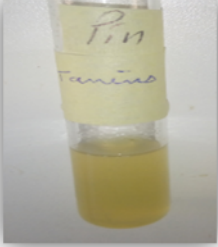
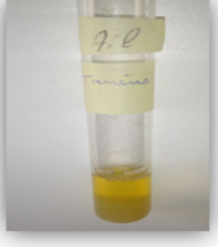

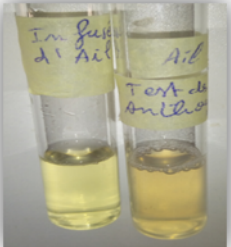
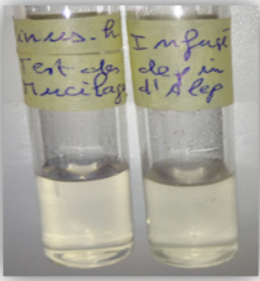
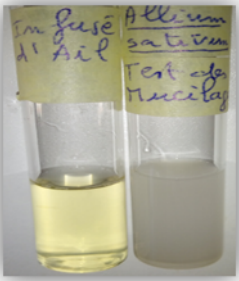
2. Résultats et discussions

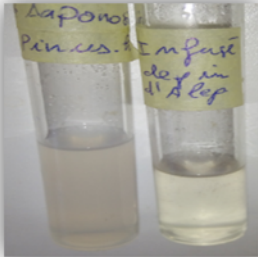
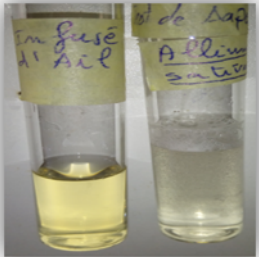


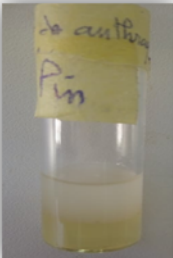
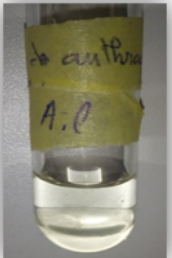


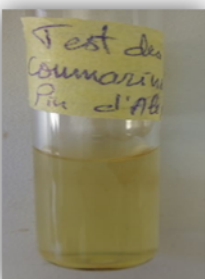
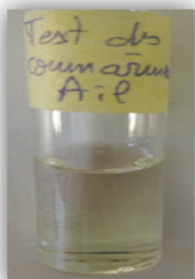
2.1. Etude phytochimique des plantes

Le screening phytochimique contribue à la mise en évidence de la présence ou l'absence des différents métabolites secondaires et primaires dans nos extraits. La présence de ces derniers est attestée par la formation d'un précipité, et le changement de coloration.

Les résultats du screening phytochimique réalisés dans les différents extraits d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill sont représentés dans les tableaux XIII.

Tableau XIII: Screening phytochimique d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill.

	<i>Pinus halepensis</i> Mill	<i>Allium sativum</i>
Recherche des tanins		
	-	-
Recherche des anthocyanes		
	-	-
Recherche des mucilages		
	-	+

<p>Recherche des saponosides</p>		
	<p>-</p>	<p>+</p>
<p>Recherche des leucoanthocyanes</p>		
	<p>+</p>	<p>+</p>
<p>Recherche des anthraquinones</p>		
	<p>-</p>	<p>-</p>
<p>Recherche des alcaloïdes</p>		
	<p>+</p>	<p>+</p>
<p>Recherche des coumarines</p>		
	<p>+</p>	<p>-</p>

(-) : absence ; (+) : présence.

Selon les résultats mentionnés dans le tableau n° XIII ; concernant les tests de la composition chimique réalisés sur la poudre et l'infusée d'ail ; nous notons la présence des mucilages, les saponosides, les leucoanthocyanes et les alcaloïdes. En revanche, une absence totale des tanins, des anthocyanes, des anthraquinones et des coumarines dans l'échantillon analysé.

D'après les résultats de test phytochimique sur la poudre et l'infusé de *Pinus halepensis* Mill mentionnés dans le tableau XII, nous avons noté que cette plante est très riche en alcaloïdes, en leucoanthocyanes et en coumarines. Tandis qu'on a remarqué une absence totale des tanins, des anthocyanes, des mucilages, des saponosides et des anthraquinones dans les graines de pin d'Alep.

2.2. Précipitation des protéines par Ethanol/Acétone

Les extractions par des solvants sont les procédures les plus couramment utilisées pour préparer les extraits de matières végétales en raison de leur facilité d'utilisation, leur efficacité et leur large applicabilité. De nombreux travaux ont rapporté que le rendement en extraction chimique dépend du type de solvant avec différentes polarités, du temps d'extraction, de la température, du rapport échantillon/solvant ainsi que de la composition chimique et des caractéristiques physiques des extraits (**Mentha Spicata, 2006**). Les solvants organiques miscibles à l'eau : l'alcool et l'acétone précipitent les protéines. Cette précipitation s'accompagne d'une dénaturation à température ambiante. Si l'on opère à 4 °C, la précipitation n'est pas dénaturante et elle est réversible (**Audigié, 1984**). Le principal inconvénient de cette méthode est le grand volume d'éthanol qu'il faut utiliser, au moins quatre fois celui de la solution protéique aqueuse. Il faut souligner en plus que la précipitation n'est pas complète, car certaines protéines sont plus ou moins solubles dans l'éthanol. Une variante plus efficace utilise de l'acétone au lieu de l'éthanol. Deux fois le volume de solution protéique est suffisant. La précipitation à l'acétone est aussi plus efficace car, contrairement à l'éthanol, très peu de protéines sont solubles dans l'acétone. Cependant la préparation de protéines résultante est très difficile à redissoudre (**Site web 4**).

2.3. Dosage des protéines totales

L'extraction des protéines a été réalisée sur deux échantillons différents : *Pinus halepensis* Mill et l'*Allium sativum*.

L'analyse quantitative de protéines est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage à base de BSA (Annexe 9).

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford a montré que le taux des protéines de l'extrait des graines de pin d'Alep est de 356.97 mg/g ; tandis que le taux protéique de l'extrait des gousses d'ail est de 93.51 mg/g (figure 21). Donc *Pinus halepensis* Mill contient un taux protéique plus élevée par rapport à l'*Allium sativum* (environ 4 fois plus fort).

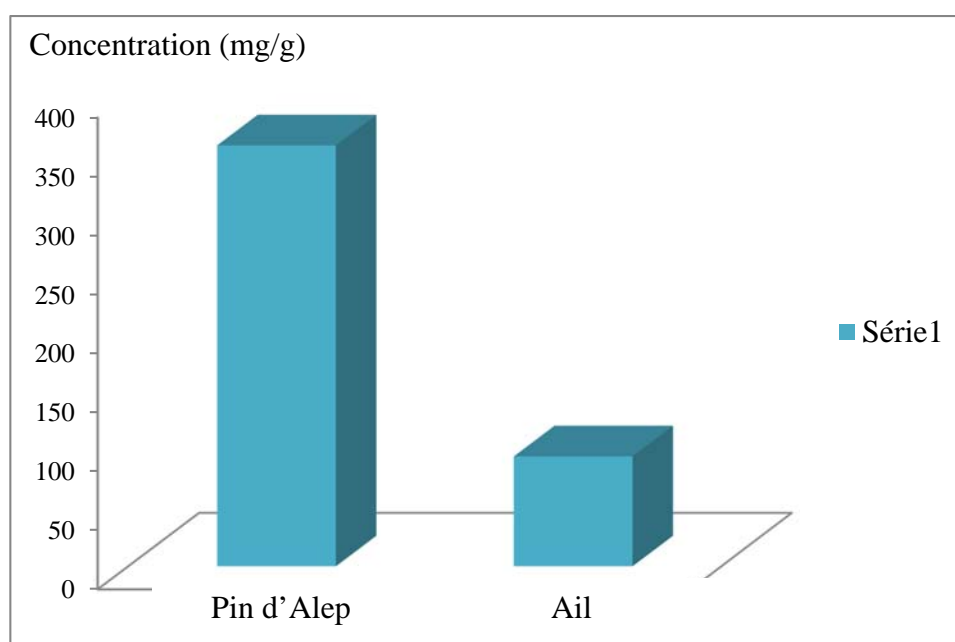


Figure 21 : Histogramme montrant le taux protéique des graines de pin d'Alep et des gousses d'Ail.

2.4. Activité anti-hémolytique sur des cellules sanguines humaines

L'activité anti-hémolytique a été évaluée en utilisant des concentrations différentes de l'extrait protéique des deux plantes étudiées, le pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse est présenté dans la figure suivante (Annexe 11 et 12) :

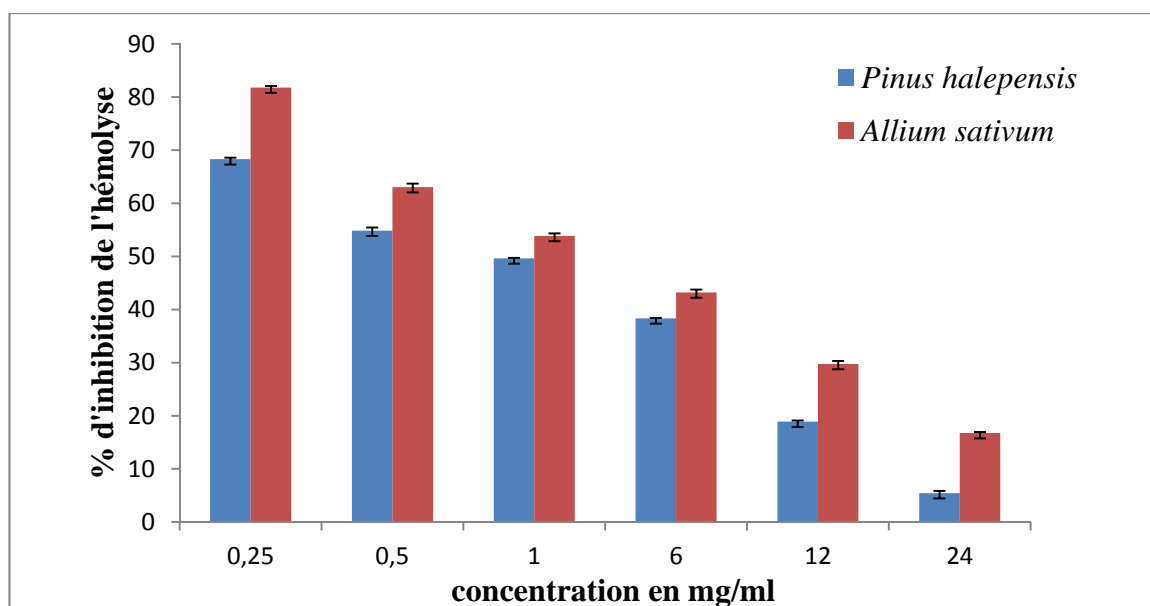


Figure 22 : Histogramme montrant le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des extraits protéiques d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill.

La gamme de la variation du pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse en fonction de la concentration de l'extrait était de 16.75 % à 81.79 % pour l'ail et de 5.43 % à 68.3 % pour le pin d'Alep.

Pour les faibles concentrations en extrait (0,25 - 0,5 et 1 mg/ml), le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse le plus élevé est enregistré pour l'*Allium sativum* avec 81.79 % - 63.04 % et 53.86 %; suivi par *Pinus halepensis* Mill avec 68.3 %- 54.84 %- 49.63 % respectivement, en comparaison avec le contrôle. Cependant pour les concentrations élevées de l'échantillon (6-12-24 mg/ml), les pourcentages de l'inhibition d'hémolyse enregistrés étaient moins importants 43.22 % - 29.74 % et 16.75 % pour l'ail et 38.34 %- 18.89 %- 5.43 % pour le pin d'Alep respectivement. Une autre opération du même genre et cela avec le standard acide ascorbique qui a exprimé une gamme d'inhibition de 84,36% à 94,65% (Annexe 13) a révélé que l'activité anti hémolytique a été élevée (*Allium sativum* : 81.79 % - 63.04 % et 53.86 %; et *Pinus halepensis* Mill : 86.3 %- 54.84 %- 49.63 %) respectivement pour (0,25 - 0,5 et 1 mg/ml) de l'extrait par rapport à ce témoin.

2.5. Etude synergétique du mélange protéique d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill.

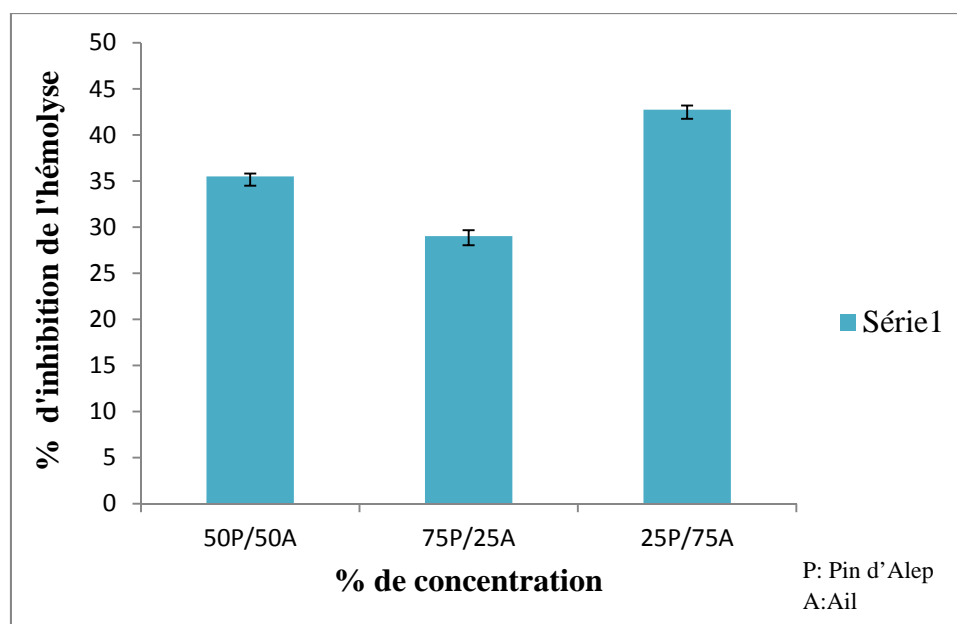


Figure 23 : Histogramme montrant le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse du mélange protéique d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill.

Dans cette étude, l'inhibition de l'hémolyse s'est avérée variable en fonction des concentrations de l'extrait utilisées (figure 23). Nous avons utilisées la concentration protéique de 0.5 mg/ml. Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse (Annexe 14) été de 35.49 % pour des pourcentages égaux des deux extraits protéiques (50 % P/50 % A). À 75 % d'extrait protéique de pin d'Alep et 25 % d'ail, nous avons signalés un pourcentage d'inhibition d'hémolyse de 29.03 %, tandis que pour un pourcentage élevé d'extrait protéique d'ail (75 %) et 25 % de pin d'Alep; le pourcentage d'inhibition d'hémolyse été un peut élever 42.74 %.

Le processus d'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu. Des facteurs proprement corpusculaires, comme l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine, règlent le degré de l'hémolyse (**Aguilar, 2007**).

Les globules rouges sont parmi les cellules les plus utilisées dans l'évaluation de la toxicité à cause de leur disponibilité, et la facilité de leur surveillance au cours de la lyse cellulaire grâce à la libération de l'hémoglobine (**Situ et Bobek, 2000**). Elles sont les cibles primaires des radicaux libre, du a la richesse en acides gras polyinsaturés (acides linoléique, acides arachidoniques en particulier). D'ailleurs, les globules rouges sont en particulier exposé aux dommages oxydants endogènes en raison de leur rôle spécifique

comme porteurs de l'oxygène (**Paiva-Martins et al., 2009**). Et au transport de l'oxygène qui lié a l'hémoglobine (**Dai et al., 2006**).

Lors de traitement des globules rouges avec H₂O₂ à des concentrations plus ou moins faible (0,25-0,5 et 1 mg/ml) ; le pourcentage d'inhibition d'hémolyse a été remarquable et très important alors que pour les concentrations dites élevés en extrait, le pourcentage d'inhibition a été moins important (Annexe 15).

L'action de H₂O₂ sur les érythrocytes provoque l'épuisement des protéines membranaires, la déformation des membranes et la perturbation des micro-constituants ce qui conduit à leurs lyse et la libération de l'hémoglobine (**Yasmeen & Hassnain, 2016**). Une étude a été réalisée par **van der Zee, Dubbelman , and van Steveninck (1985)** qui ont montré que l'exposition des érythrocytes au H₂O₂ a provoqué une peroxydation lipidique membranaire qui ne s'est produite qu'avec la présence d'hémoglobine, ce qui indique un rôle médiateur de l'hémoglobine dans ce processus et une perméabilité passive aux cations (K⁺) qui a été causé par l'oxydation des groupes sulfhydriles SH libres, c'est à dire celles qui présentent de nombreux résidus cystéines, des protéines membranaires ainsi que les chaînes aliphatiques, et des cycles aromatiques (**van der Zee et al., 1985**).

La membrane lipidique n'est pas assez résistante pour assurer seule la conservation de la forme d'une cellule aussi grande que l'érythrocyte. Les interactions horizontales entre la spectrine, la protéine 4.1 et l'actine sont à l'origine de la formation du squelette qui donne sa forme aux érythrocytes (**Ralston, 1978 ; Faure, 2007**). Ce réseau de protéines périphériques permet de réguler la forme du globule rouge, en stabilisant la membrane et en modulant ses capacités de déformation (**Ralston, 1978 ; Faure, 2007**).

En effet, l'interaction entre les protéines de l'extrait avec celle des érythrocytes qui ont des fonctions biologiques importantes: elles contrôlent la morphologie de la cellule, les mécanismes de transfert et les activités enzymatiques, a probablement été la cause de la protection contre l'hémolyse. Cette interaction peut être lieu au niveau des acides aminés érythrocytaires qui ont le groupe SH ce qui empêche leurs oxydation donc à l'inhibition de la perte passive des cations telle que les ions K⁺ avec le maintien de structure et l'intégrité membranaire. Comme il est possible que la protection des érythrocytes se fait d'une manière indirecte en présence des protéines de l'extrait qui entrent en compétition avec les protéines membranaire citées précédemment pour le piégeage des radicaux libérés par H₂O₂ ce qui a permis la protection des érythrocytes contre l'hémolyse ; car les agents radicalaire qui attaquent les protéines en particulièrement les acides aminées : l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine provoquera l'oxydation de certains

résidus avec, par conséquent, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes, et certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats (Haleng *et al.*, 2007).

L'*Allium sativum* montre une activité peroxydasique totale de 537,03 U (De Araujo *et al.*, 2004). Les pH optima d'activité des peroxydases varient entre 4 et 6,5 et celle de l'ail est de 5.5 à 6.5 (Makhloufi, & Matmer, 2018). D'autres auteurs, tels que Bhunia *et al.*, (2002); Dicko *et al.*, (2006), ont montré que les activités des Peroxydases POXs augmentent généralement avec la diminution du pH. Les températures optimales d'activité des peroxydases sont de 40 °C (Makhloufi & Matmer, 2018). En plus, El Ichi *et al.*, (2008) ont confirmés qu'il ya une relation entre la température et l'activité des peroxydases ; et ils ont rapporté une température optimale de 30 °C avec une peroxydase isolée des bulbes d'*Allium sativum* de Tunisie. La présence de peroxydases qui sont de nature protéique dans l'ail peut avoir un effet protecteur sur les érythrocytes. L'Ail possède une isoenzyme Peroxydase POX qui a été purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie d'échange d'anions. Deux isoformes ont été désignées : POX (1A) et POX (1B) (Marzouki *et al.*, 2005). Le POX (1B) s'est avéré fortement active à 40 et 50 °C pendant 40 minutes et son pH optimal était d'environ 5 (El Ichi *et al.*, 2008). Fait intéressant, la comparaison de la stabilité en température entre POX2 et une enzyme immobilisée a montré que la forme immobilisée de POX2 conservé toute son activité pendant 35 minutes à 60 °C. En outre, l'isoenzyme POX2 conservé sa pleine activité pendant au moins 6 semaines pendant le stockage à 25 °C (Marzouki *et al.*, 2005). Ce résultat est presque identique avec les conditions de notre travail ce qui confirme la présence de l'activité anti-hémolytique parce que les peroxydases sont actives.

Selon le même auteur, le mode d'action de ces POX est basé sur la réduction de l'eau oxygénée (H₂O₂) en H₂O. Une autre étude a montré que l'enzyme POX1B avait une bonne affinité vers H₂O₂; donc la réduction de la concentration de ce dernier ce qui augmente l'effet anti-hémolytique (El Ichi *et al.*, 2008). En outre, l'extraction avec de l'éthanol à 25 °C conduit à Allicine (Majewski, 2014 ; Ghesquiere, 2016), qui possède le pouvoir de piégeage des radicaux libres donc la réduction de la concentration de H₂O₂ ce qui augmente l'effet anti-hémolytique (Goetz, *et al.*, 2012).

La comparaison de ces paramètres avec ceux appliqués (conditions optimales) lors d'extraction des protéines de l'ail qui ont été: temps de macérations 1 h, pH= 6 et

température de 24,23 °C sont presque identique aux nôtres, ce qui a préservé l'activité de l'enzyme, donc la réduction de (H₂O₂) dans le milieu réactionnel. Ce qui peut aboutir à la diminution de la concentration de ce dernier donc moins d'hémolyse.

L'inhibition de l'hémolyse peut être aussi due aux interactions de type hydrophobes entre les protéines de l'extrait vis-à-vis des lipides membranaires des érythrocytes en particulier avec les acides gras polyinsaturés qui sont la cible des oxydations (**Cillard & Cillard, 2006**), ce qui les protège contre la destruction et l'oxydation. Cependant, l'évolution de l'activité anti-hémolytique a été inversement proportionnelle à la concentration de l'extrait, c'est-à-dire, plus la concentration de l'extrait diminue plus le pourcentage d'inhibition augmente et cela a été, probablement, causé par la présence des enzymes de type protéases et phospholipases dans l'extrait protéique de l'ail selon des études qui ont été réalisées et qui sont citées dans les paragraphes suivants. Ces enzymes présentent une activité remarquable lorsqu'ils sont présents à des concentrations élevées (6, 12 et 24 mg/ml) mais au fil des dilutions de l'extrait, l'activité de ces enzymes diminue et l'effet d'inhibition d'hémolyse commence à apparaître et à augmenter.

Selon **Khatoon, Talat, and Younus (2008)**, les bulbes d'*Allium sativum* (ail) possèdent une phospholipase de type D (EC 3.1.4.4) dotée d'une activité lipolytique dont la température optimale a été estimée au voisinage de 70 °C et une activité maximale observée lors de la présence d'une concentration de 70 mM de calcium.

Mais à une température ambiante, la phospholipase présente une activité enzymatique moins importante d'où la possibilité de confirmation de notre hypothèse citée précédemment sur l'intervention des phospholipases lorsque l'extrait protéique a été utilisé avec des concentrations plus ou moins élevées. En revanche, la même hypothèse qui explique mieux l'augmentation de l'effet anti-hémolytique avec la diminution de concentration de l'extrait utilisé.

L'ail se caractérise par la présence d'une protéase à cystéine qui est une enzyme protéolytique, qui présente une activité même à des températures modérées de 40 jusqu'à 50 °C et pour une durée de temps allant jusqu'à 60 min selon une étude réalisée par (**Parisi et al., 2002**). Une autre étude a été réalisée par **Halmi et al., (2014)** sur les protéases des bulbes de l'ail a montré que ces derniers ont une activité optimale à un pH de 6,0, une température à 40 °C et le temps d'incubation de 60 minutes. Les études citées précédemment confirment plus l'intervention des protéases dans l'apparition de l'hémolyse lors de l'utilisation de concentrations élevées de l'extrait, ce qui n'a pas protégé les érythrocytes.

L'évaluation du pourcentage d'inhibition révèle que l'extrait protéique des graines de *P. halepensis* Mill possède une activité anti-hémolytique sur les cellules sanguines humaines ; probablement en utilisant plusieurs mécanismes d'actions. Selon **Beaudeau et Durand, (2008)** ; **GerhandVogel, (2008)**, cet extrait a présenté une capacité antioxydante importante, suggérant que l'inhibition de la production des radicaux libres constitue l'un des mécanismes de l'activité anti-hémolytique de cette plante. Plusieurs travaux de recherche menés sur l'étude du processus anti-hémolytique ont indiqué une libération de radicaux libres par les neutrophiles et les macrophages.

La désorganisation des membranes érythrocytes, la libération de l'hémoglobine provoquent la génération de fer. L'oxydation épuise la teneur en protéines, déforme les érythrocytes et déränge la microcirculation (**Yasmeen and Hassnain, 2016**).

Ceci peut se produire en raison de la nature d'oxydation avec la dégradation des membranes des cellules et au dégagement d'hémoglobine par son oxydation en méthémoglobine (**Paiva-Martins et al., 2009**). Le H₂O₂ causent également la mobilisation de Fe²⁺ par Ca²⁺ par l'intermédiaire de réduction de Fenton aboutissant à la production des intermédiaires radicalaires OH⁻ (**Paiva-Martins et al., 2009**). Tous ces facteurs combinés causent la déstabilisation de la membrane des cellules, qui probablement régit l'événement de la lyse cellulaire.

Après avoir mélangé les extraits protéiques d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill ; le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse été remarquable pour un pourcentage d'extrait protéique d'ail (75 %) et (25 %) de pin d'Alep (figure 26). Ceci peut se traduire par l'hypothèse qui explique que c'est la nature et le type de protéines qui a un effet anti-hémolytique et non pas la quantité de ces dernières ; par ce que les protéines ne représentent que 6% de la composition totale de l'ail (**Trudel, 2005**) ; tandis qu'elles représentent 26.62 % pour le pin d'Alep (**Cheikh-rouhou et al., 2007**; **kadri et al., 2014**).

Selon **Keenan et al., (1973)** ; **Rossignol, (1976)**, *P. halepensis* Mill contient la phospholipase D. De plus, **Baquedano et al., (2008)**, a confirmé que cette plante possèdent aussi des enzymes douées d'une activité antioxydantes (Peroxidase (POD), Ascorbate Peroxydase (APX), Superoxide dismutase (SOD), et Gluthation Réductase (GR)). En outre, **Tommasi, & Paciolla, (2000)** ont montrés que le pin d'Alep se caractérise par la présence d'une enzyme péroxidaique l'Ascorbate Peroxydase (APX) qui possède une activité optimale de 490 (nmoles d'ascorbate oxydé min⁻¹ mg prot⁻¹) à un pH de 6.2 ; en

comparant avec l'ail qui montre une activité peroxydasique totale de 537,03 U (De Araujo *et al.*, 2004), et d'autres protéines cités précédemment.

Dans une autre étude montre, Yang *et al.*, (2017) ont montrés que *Picea Schrenkiana*, une plante de la même famille, possède les mêmes enzymes antioxydantes que celles de pin d'Alep avec une activité antioxydante de 56 % des POD, de 29 % des APX, de 58% des SOD, et de 20 % pour les activités antioxydante des GR après traitement par DHAP 0,5 mM. Les études citées précédemment confirment l'hypothèse proposée et représentent bien l'effet de la nature des protéines sur l'activité anti-hémolytique.

**CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Ce travail s'est focalisé sur l'étude phytochimique, l'extraction de la fraction protéique, et l'étude de l'activité anti-hémolytique des deux espèces : l'*Allium sativum* et le *Pinus halepensis* Mill sur des cellules sanguines humaines.

Nos travaux de screening phytochimique, concernant nos deux espèces cibles, ont permis de détecter les différentes familles de composés existants dans les deux plantes notamment les leucoanthocyanes et les alcaloïdes. L'extraction et la précipitation avec l'acétone et l'éthanol a été une technique adoptée afin d'isoler le maximum de fractions protéiques. L'extraction par macération avec l'utilisation du broyat de l'ail frais a donné une concentration protéique de 93.51 mg/ml dont les conditions optimales ont été : un pH de 6,22, un temps de macération de 1h 42 min, et une température de 24,53 C° ; et le taux des protéines de l'extrait des graines de pin d'Alep été de 356.97 mg/ml.

Enfin, l'étude de l'activité anti-hémolytique de l'extrait protéique a été réalisée sur les érythrocytes humains, le pourcentage le plus significative d'inhibition de l'hémolyse a été de 81.79 % pour l'*Allium sativum* et de 68.3 % pour le *Pinus halepensis* Mill avec une concentration protéique de 0,25 mg/ml. Tandis que pour le mélange protéique des deux espèces, le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été de 42.74 % avec un extrait protéique d'ail (75 %) et (25 %) de pin d'Alep ; tous ces résultats confirment le grand effet protecteur de l'extrait protéique des deux plantes étudiés.

Les résultats obtenus lors de ce travail soulèvent de nouvelles questions et suggèrent ainsi certaines orientations futures de la recherche :

- Sur l'extraction : l'utilisation des autres techniques d'extraction des protéines.
- Sur la purification : l'utilisation de techniques plus performantes pour la purification et la caractérisation de ces protéines telle que la HPLC, électrophorèse native et bidimensionnelle, chromatographie d'exclusion moléculaire, chromatographie d'échange d'ions;
- Sur les activités biologiques : élargir le spectre de l'activité anti-hémolytique en utilisant extraits de ces deux plantes. Etudier l'activité antifongique, voir même, l'activité antioxydante et anticoagulante.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- **Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F. Z., Lazzouni, H. A., Rebiahi, S. A., & Ziani_Cherif, C.** (2011). Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5433-5436.
- **Alice Gerges Geagea.** (2015). *Les Bienfaits de l'Ail sur la Santé*. Phytothérapie. HUMAN & HEALTH, N°3, 46- 47p.
- **Alinezhad, H., Baharfar, R., Zare, M., Azimi, R., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M.** (2012). Biological activities of ethyl acetate extract of different parts of hyssopus angustifolius. [comparative study]. *Pharm biol*, 50(8), 1062-1066. Doi: 10.3109/13880209.2012.655859
- **Al-Qattan, K.K., Thomson, M., Jayasree, D., Ali, M.** (2016). Garlic attenuates plasma and kidney ace-1 and angii modulations in early streptozotocin-induced diabetic rats: Renal clearance and blood pressure implications. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 8142394.
- **Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y.** (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of nutrition*, 131(3), 955S-962S.
- **Ankri, S., & Mirelman, D.** (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and infection*, 1(2), 125-129.
- **Arvy, M. P., & Gallouin, F.** (2015). *Épices, aromates et condiments*. Belin.
- **Bachmann J.** Cultiver l'ail biologique [Internet]. 2001 [cité 10 nov 2015]. Disponible sur: http://www.organicagcentre.ca/Docs/ATTRA/garlic_production_f.pdf
- **Bachmann, J., & Hinman, T.** (2008). Garlic: Organic Production. *National Center for Appropriate Technology, une publication d'ATTRA, États-Unis. [En ligne]*.
- **Baquedano, F. J., Valladares, F., & Castillo, F. J.** (2008). Phenotypic plasticity blurs ecotypic divergence in the response of *Quercus coccifera* and *Pinus halepensis* to water stress. *European Journal of Forest Research*, 127(6), 495-506.
- **Balasantil, S., Rao, K. S., & Nagini, S.** (2003). Altered cytokeratin expression during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. *Polish journal of pharmacology*, 55(5), 793-798.

- **Bellefontaine R.**, 1979 – Variation morphologique des fleurs d'un *Pinus halepensis* Mill .Ann.Rech.Forest.du Maroc.19, 417-425
- **Belvaux, E.** (1992). Utilisation du bois de pin d'Alep (*Pinus halepensis*): présentation d'un essai de transformation. Forêt méditerranéenne.
- **Benkeblia, N.** (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-food science and technology*, 37(2), 263-268.
- **Bentouati, A.** (2006). Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis* m.) du massif de Ouled Yagoub (Khenchela-Aurès) (Doctoral dissertation, Université de Batna 1-Hadj Lakhder).
- **Benzeggouta, N.** (2005). Etude De l'Activité Antibactérienne Des Huiles Infusées De Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments.Magistère, Mentouri, Constantine. Retrieved from <https://bu.umc.edu.dz/theses/chimie/BEN4319.pdf>
- **Berthet J, Amar-Costesec A.** (2006). Dictionnaire de biologie. Bruxelles: De Boeck, n°1366, 1034p.
- **Berthet, O.** (2014). Y A-T-Il Une Place Pour La Phytothérapie Dans La Prévention Des Maladies Cardiovasculaires ? .Doctorat, Joseph Fourier. Retrieved from <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01025271/document>
- **Bhunias A., Durani S. and Wangikar P.P.** (2002). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*. 72: 562–567.
- **Bobbou, Aboubakr Essedik.** (2016). Contribution à l'étude d'inventaire de peuplement de pin d'Alep du forêt de Sig (forêt de Moulay Ismail). Tlemcen, Université de Tlemcen.84p.
- **Boudy, P.** (1950). Economie forestière Nord-africaine-Tome 2: monographies et traitements des essences forestières. E. larose.
- **Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Ijic, R.** (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111(4), 925-929.
- **Bravo, L.** (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- **Bruneton, J.** (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. English.
- **Cantwell, M. I.** (2000). Alliin in garlic. *Perishables Handling Q*, 102: 5-6.

- **Cellini, L., Di Campli, E., Masulli, M., Di Bartolomeo, S., & Allocati, N.** (1996). Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 13(4), 273-277.
- **Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H.** (2006). Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food science and technology international*, 12(5), 407-415.
- **Cillard, J., & Cillard, P.** (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.
- **Colin, L.** (2016). L'ail et son intérêt en phytothérapie (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- **Dai, F., Miao, Q., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L.** (2006). Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sciences*, 78(21), 2488-2493.
- **De Araujo, B. S., de Oliveira, J. O., Machado, S. S., & Pletsch, M.** (2004). Comparative studies of the peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Plant Science*, 167(5), 1151-1157.
- **Dethier, B.** (2010). *Contribution à l'étude de la synthèse de l'alliine de L'ail*. Master, Liège. Retrieved from <file:///C:/Users/Devil/Downloads/TFE%20B%20DETHIER.pdf>
- **Diallo, D.** (2000). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae) (Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté des sciences).
- **Dicko, M. H., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A. G., & van Berkel, W. J.** (2006). Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. *The FEBS journal*, 273(10), 2293-2307.
- **Dilem, A.** (1992). Déterminisme de quelques propriétés de base du bois de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.): conséquences sur la sélection, la sylviculture et l'évaluation de la qualité de la ressource (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).

- **Din, N., Dibong, S. D., Mpondo, E. M., Priso, R. J., Kwin, N. F., & Ngoye, A.** (2011). Inventory and identification of plants used in the treatment of diabetes in Douala Town (Cameroon). *European Journal of Medicinal Plants*, 1(3), 60-73.
- **Douaouya L.** (2016). Investigation phytochimique et étude des activités biologiques d'une variété locale de *Allium sativum*. Thèse de doctorat ès sciences en biochimie, Faculté des sciences département biochimie, Annaba, 135 p.
- **Dufresne C, Ouellet C.** (2010). Filière des plantes médicinales biologiques du QUÉBEC. L'ail, Guide de production sous régie biologique [En ligne]. Québec, 29 p. Disponible sur : FPMQ : www.plantesmedicinales.qc.ca
- **Dupont, F., & Guignard, J. L.** (2012). Botanique: Les familles des plantes. Elsevier Health Sciences.
- **Ebrahimzadeh, M. A.** (2013). Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits. *Fruits*, 68(3), 185-193.
- **Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S., & Eslami, B.** (2010). Antihemolytic and antioxidant activities of allium paradoxum. *Open life sciences*, 5(3). Doi: 10.2478/s11535-010-0013-5
- **Elberling J. et Skov P.S.**, (2007). Increased release of histamine in patients with respiratory symptoms related to perfume. In : Les huiles essentielles. Clin Exp Allergy. Nov, 37 (11): 1676-80.
- **El Ichi, S., Abdelghani, A., Hadji, I., Helali, S., Limam, F., & Marzouki, M. N.** (2008). A new peroxidase from garlic (*Allium sativum*) bulb: its use in H₂O₂ biosensing. *Biotechnology and applied biochemistry*, 51(1), 33-41.
- **Eyo, J. E., Ozougwu, J. C., & Echi, P. C.** (2011). Hypoglycaemic Effects of Allium Cepa, Allium Sativum and Zingiber Officinale Aqueous Extracts on Alloxan Induced Diabetic Rattus Novergicus. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 109(430), 1-6.
- **Farjon A.** (2005). L. Brill, Pins. Schémas et descriptions du genre *Pinus*.
- **Farnsworth, N. R.** (1988). Screening plants for new medicines. *Biodiversity*, 15(3), 81-99.
- **Faure, M.** (2007). Effet du pourcentage d'oxygène inhalé sur les propriétés membranaires et la fragilité osmotique des globules rouges du cheval sous anesthésie volatile, évaluation du stress oxydant (Doctoral dissertation).

- **Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., & Costa, J.** (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian pacific journal of tropical disease*, 4(2), 97-103.
- **Gerbeaud X.** Ail - *allium sativum* [Internet]. gerbeaud.com. (2008) [cité 13 oct 2015]. Disponible sur: <http://www.gerbeaud.com/fruit-legume-de-saison/ail-allium-sativum.php>
- **Gerges Geaga, A.** (2015). Les Bienfaits de l'Ail sur la Santé. *HUMAN & HEALTH*. 31:46-47.
- **Ghesquiere, C.** (2016). Les bienfaits de l'ail dans les maladies cardiovasculaires. doctorat Picardie jules verne. Retrieved from <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01443858/document>
- **Ghnimi, W.** (2015). Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- **Ghourri, M., Zidane, L., & Douira, A.** (2013). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(4), 1688-1700.
- **Goetz, P., & Ghedira, K.** (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer Science & Business Media.
- **Gonen, A., Harats, D., Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., ... & Shaish, A.** (2005). The antiatherogenic effect of allicin: possible mode of action. *Pathobiology*, 72(6), 325-334.
- **Guemouni S.** (2016). Etude comparative du séchage par micro-onde et à l'étuve de l'ail « *Allium sativum* ». Université A. MIRA – Bejaia. Sciences des aliments.
- **Guiet, A.** (2011). L'apport de marrubium Valgare L dans la Prévention du risque cardiovasculaire doctorat, NANTES. Retrieved from [file:///C:/Users/Devil/Downloads/guierPH11%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Devil/Downloads/guierPH11%20(3).pdf)
- **Hassan, H. T.** (2004). Ajoene (natural garlic compound): a new anti-leukaemia agent for AML therapy. *Leukemia research*, 28(7), 667-671.

- **Heller, W., Britsch, L., Forkmann, G., & Grisebach, H.** (1985). Leucoanthocyanidins as intermediates in anthocyanidin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana* R. Br. *Planta*, 163(2), 191-196.
- **Hickey, M.** (2012). *Growing garlic in NSW*. New South Wales. Department of Primary Industries.
- **Hijazi, M.** (2011). Caractérisation structurale et fonctionnelle d'AGP31, une glycoprotéine atypique de la paroi chez *Arabidopsis thaliana* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- **Iserin, P.** (2001). Encyclopedia of Medicinal Plants. Département de phytothérapie à la faculté de médecine de Bobigny, Larousse. p 59.
- **Jakubowski, H.** (2003). On the health benefits of *Allium* sp. *Nutrition*, 19(2), 167.
- **Jean-Michel, Clément.** (1990). Larousse Agricole. 39-40.
- **Jung, S.** (2005). Apport des drogues végétales dans la prévention des maladies cardiovasculaires liées à l'hypercholestérolémie (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P.** (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- **Halmi, M. I. E.** (2014). The application of plant proteases from garlic (*Allium sativum*) for biomonitoring of heavy metals in the environment. *Asian Journal of Plant Biology*, 2(2), 53-59.
- **Kadari, A.** (2012). Etude exploratoire des acides gras polyinsaturés des aiguilles de Pin (Doctoral dissertation).
- **Kadik, B.** (1987). Contribution à l'étude du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie: écologie, dendrométrie, morphologie (Doctoral dissertation).
- **Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., & Montero, J. L.** (2014). Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial crops and products*, 54, 6-12.
- **Kamanna, V. S., & Chandrasekhara, N.** (1982). Effect of garlic (*Allium sativum* Linn) on serum lipoproteins and lipoprotein cholesterol levels in albino rats rendered hypercholesteremic by feeding cholesterol. *Lipids*, 17(7), 483-488.

- **Khatoon, H., Talat, S., & Younus, H.** (2008). Phospholipase D from *Allium sativum* bulbs: a highly active and thermal stable enzyme. *International journal of biological macromolecules*, 42(4), 380-385.
- **Keenan, T. W. Leonard, R. T. et Hodges, T. K.** (1973) *Cyrobios* 7. 103.
- **Khouja, M. L.** (1997). Variabilité géographique du pin d'Alep en Tunisie: perspectives d'amélioration de la productivité et de la qualité physique du bois.
- **Kissileff, H. R., Carretta, J. C. Geliebter, A. & Pi-Sunyer, F. X.** (2003). Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(5), R992-R998.
- **Křmár M.** L'ail: saveurs et vertus. Paris: Grancher; 2008, 170p.
- **Kundra, A.** (2015). Department of Biotechnology and Medical Engineering National Institute of Technology, Rourkela.Rourkela.
- **Lahouati, R.** (2000). Expérience des Plantations en Climat Aride. Cas de la Ceinture Verte en Algérie. Direction Générale des forêts, *Ministère de l'Agriculture. (Alger, Algeria)*.
- **Lee, J. & Harnly, J. M.** (2005). Free amino acid and cysteine sulfoxide composition of 11 garlic (*Allium sativum* .) cultivars by gas chromatography with flame ionization and mass selective detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(23), 9100-9104.
- **Lucienne A.** Les plantes médicinales d'Algérie, 2 ème Ed. Berti, Alger, 2010, p. 200-201.
- **Lu, H. F., Sue, C. C., Yu, C. S., Chen, S. C., Chen, G. W., & Chung, J. G.** (2004). Diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells. *Food and chemical toxicology*, 42(10), 1543-1552.
- **Macchioni, F., Cioni, P. L., Flamini, G., Morelli, I., Perrucci, S., Franceschi, A., ... & Ceccarini, L.** (2002). Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16), 4586-4588.
- **Maestre, F. T., & Cortina, J.** (2004). Insights into ecosystem composition and function in a sequence of degraded semiarid steppes. *Restoration Ecology*, 12(4), 494-502.

- **Makhloufi, H., & Matmer, R.** (2018). Etude de l'effet de la contamination du sol par les carburants sur des propriétés biologiques (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- **Marzouki, S. M., Limam, F., Smaali, M. I., Ulber, R., & Marzouki, M. N.** (2005). A new thermostable peroxidase from garlic *Allium sativum*. Applied biochemistry and biotechnology, 127(3), 201-214.
- **Maurice S.** Cultivez votre ail [Internet]. Ail Québec - Association des producteurs. 2015 [cité 13 oct 2015]. Disponible sur: <http://ail.quebec/decouvrez-ail-du-quebec/cultiver-votre-ail/>
- **Medjdoub, Ouissam .Oubernine, Hanane.** (2017). Activité antioxydante et anti-inflammatoire de pin, Bejaia, Université A. MIRA.55p.
- **Majewski, M.** (2014). *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 65(1).
- **Mentha Spicata, L.** (2018). screening phytochimique d'une plante médicinale: *Mentha Spicata L.*
- **Metwally, M. A. A.** (2009). Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1(1), 56-64.
- **Meynadier, J. M., Raison-Peyron, N., Meunier, L., & Meynadier, J.** (1997). Allergie aux parfums. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 37(5), 641-650.
- **Mezali, M.** (2003). Rapport sur le secteur forestier en Algérie. In 3ème session du forum des Nations Unis sur les forêts (Vol. 7, pp. 39-46).
- **Mibindzou Mouellet A.** (2004) . - Screening phtochimique de deux espèces de plantes : *Crotalia retusa L* (papilionaceae) et *Hallea ciliata Aubrev & Pellegr.* (rubiaceae) récoltées au Gabon, thèse de doctorat, Mali, 58 p.
- **Minker, C.** (2012). Ail et autres alliacés: Un concentré de bienfaits pour votre santé, votre beauté et votre jardin. Editions Eyrolles.
- **Mirko, V.** (1991). conifères : Morphology and variation.755 p.
- **Mouilah, Y.** (1988). Contribution à l'étude de la régénération naturelle du Pin d'Alep (*pinus halepensis*) dans le foret Touazizine Telagh. Institut de technologie agricole de Mostaganem. 67 p.

- **Moumen F.** (2016). Valorisation des plantes condimentaires cultivées et spontanées dans l'ouest algérien : cas du genre *Allium*. Thèse de doctorat ès sciences de l'environnement, Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès, Sidi Bel Abbès, 171 p.
- **Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Setzer, W. N., Nabavi, S. A., Nabavi, S. A., & Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A., & Yehudith, B.** (1975). Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *Agric. Food chem.*, 24, 1174 -1177
- **Nagini, S.** (2008). Cancer chemoprevention by garlic and its organosulfur compounds-panacea or promise. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 8(3), 313-321.
- **Nahal, I.** (1962). Le Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. In *Annales de l'école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences*. ENEF, Ecole nationale des eaux et forêts, Nancy (FRA).
- **Nakagawa H., Tsuta K., Kiuchi K., Senzaki H., Tanaka K., Hioki K. et Tsubura A.** (2001). Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 22 (6) : 891-897.
- **Ozenda, P.** (2006). Les végétaux : organisation et diversité biologique. 2ème éd, Dunod, Paris, 516p.
- **Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Rocha, S., Nascimento, H., Vitorino, R., Amado, F., ... & Santos-Silva, A.** (2009). Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Molecular nutrition & food research*, 53(5), 609-616.
- **Parisi, M., Moreno, S., & Fernández, C.** (2002). Characterization of a novel cysteine peptidase from tissue culture of garlic (*Allium sativum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(6), 608-612.
- **Poupon, H.** (1970). Sur la croissance de quelques espèces de pin dans ses rapports avec le climat du nord de la Tunisie.
- **Quézel, P.** (1980). Biogéographie et écologie des conifères sur le pourtour méditerranéen. *Actualités d'écologie forestière: sol, flore, faune/ouvrage collectif* présenté par P. Pesson; avec la participation de F. Mangenot et al.
- **Quézel, P.** (1986). Les pins du groupe «Halepensis»: écologie, végétation, écophysologie. *Options méditerranéennes*, 11-24.

- **Quezel, P., & Médail, F.** (2003). Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen, Coll. *Environnement/Series Environmental*, 576p.
- **Raco, M.** (2016). Elimination of veruses in galic (*Allium sativum* L) by different methodes Brno.
- **Ralston, G. B.** (1978). The structure of spectrin and the shape of the red blood cell. *Trends in Biochemical Sciences*, 3(3), 195-198.
- **Rao, M. R., Palada, M. C., & Becker, B. N.** (2004). Medicinal and aromatic plants in agroforestry systems. In *New Vistas in Agroforestry* (pp. 107-122). Springer, Dordrecht.
- **Rossignol, M.** (1976). Composition lipidique des racines de diverses espèces cultivées. *Phytochemistry*, 15(12), 1893-1896.
- **Santhosha, S. G., Jamuna, P., & Prabhavathi, S. N.** (2013). Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Bioscience*, 3, 59-74.
- **Seigue, A.** (1985). forêt circumméditerranéenne et ses problèmes. Maisonneuve et Larose.
- **Seki, T., Hosono, T., Hosono-Fukao, T., Inada, K., Tanaka, R., Ogihara, J., & Ariga, T.** (2008). Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(S1), 249-252.
- **Sendl, A.** (1995). *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 1 Chemistry, analysis, history, botany. *Phytomedicine*, 1(4), 323-339.
- **Senninger F.** (2009). L'ail et ses bienfaits. Saint-Julien-en-Genevois; Genève-Bernex: Editions Jouvence; 94p.
- **Sébahoun, G.** (2005). Hématologie clinique et biologique. Wolters Kluwer France.
- **Sghaier, T.** (2005). Contrôle de l'hétérogénéité spatiale dans des essais comparatifs de provenances de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) installés dans les arboreta de Tunisie. Institut National Agronomique de Tunisie,(Thèse de doctorat), 126, 41.
- **Sheela, C. G., & Augusti, K. T.** (1992). Antidiabetic effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from garlic *Allium sativum* Linn. *Indian journal of experimental biology*, 30(6), 523-526.
- **Si Bennasseur, A.** (2005). Référentiel pour la Conduite Technique de l'ail (*Allium sativum*). *Researchgate*, 1-9

- **Singh, G., & Chaturvedi, G. N.** (2015). Experimental Study on Anticoagulant and Fibrinolysis Activities of Garlic (*Allium sativum*). *Journal of Ayurveda Physicians & Surgeons* (JAPS)(EISSN 2394-6350), 2(4).
- **Site web 1 :** www.pinsdefrance.com/les-pin-de-france/le-genre-pinus/.
- **Site web 2 :** <http://www.tela-botanica.org/bdtdfx-nn-3276-synthese>. 14/03/2019.
- **Site web 3 :** <http://www.msila-dz.org>. Site officiel de la wilaya de M'sila
- **Site web 4 :** www.pinsdefrance.com/les-pin-de-france/le-genre-pinus/.
- **Situ, H., & Bobek, L. A.** (2000). In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6), 1485-1493.
- **Soro, T. Y., Traore, F., & Sakande, J.** (2009). Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *Comptes Rendus Biologies*, 332(4), 371-377. Techniques utilisées en biochimie dénaturation et précipitation des protéines [en ligne]. Disponible sur : «www8.umoncton.ca/umcm-gouthier-didier//siitub/propripic.html» (consulter le 02/06/2019).
- **Suleria, H. A. R., Butt, M. S., Khalid, N., Sultan, S., Raza, A., Aleem, M., & Abbas, M.** (2015). Garlic (*Allium sativum*): diet based therapy of 21st century—a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(4), 271-278.
- **Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A.** (2005). Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc.
- **Tillman-Sutela, E., Johansson, A., Laakso, P., Mattila, T., & Kallio, H.** (1995). Triacylglycerols in the seeds of northern Scots pine, *Pinus sylvestris* L., and Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. *Trees*, 10(1), 40-45.
- **Tommasi, F., & Paciolla, C.** (2000). Cytosolic ascorbate peroxidase in Gymnosperms. *Plant Biosystems*, 134(2), 227-232.
- **Touil, A., Litaïem, J., & Zagrouba, F.** (2015). Isothermes de sorption et propriétés thermodynamique de l'*Allium sativum*. *Journal of the Tunisian Chemical Society*, 17, 105-114.
- **Trease, E.** (1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62. *KARUMI Y, ONYAYILI PA et OGUGDUAJA*, 2004, 179-182.
- **Trudel, R.** (2005). Protéine de l'ail, *Allium sativum*, au service de la lutte contre des insectes piqueurs-suceurs (Homoptera). *Phytoprotection*, 86(2), 87-87.

- **Van der Zee, J., Dubbelman, T. M. A. R., & Van Steveninck, J.** (1985). Peroxide-induced membrane damage in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 818(1), 38-44.
- **Vennetier, M., Ripert, C., Brochiéro, F., Rathgeber, C., Chandioux, O., & Estève, R.** (2010). Évaluation de la croissance du pin d'Alep en région méditerranéenne française. *Revue forestière française*, 2010(5), 11-p.
- **Wargovich, M. J.** (1987). Diallyl sulfide, a flavor component of garlic (*Allium sativum*), inhibits dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Carcinogenesis*, 8(3), 487-489.
- **Wichtl, M., Anton, R., Bernard, M., & Czygan, F. C.** (2003). Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec & Doc; Ed. médicales internationales.
- **Woods, S. C.** (2004). Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(1), G7-G13.
- **Yang, L., Ruan, X., Jiang, D., Zhang, J., Pan, C., & Wang, Q.** (2017). Physiological effects of autotoxicity due to DHAP stress on *Picea schrenkiana* regeneration. *PloS one*, 12(5), e0177047.
- **Yasmeen, H., & Hassnain, S.** (2016). Comparative analysis of different bioactivities of *Curcuma longa*, *Nigella sativa* seeds, and *Camellia sinensis* extracted by four different methods: a green way to reduce oxidative stress. *Food science and biotechnology*, 25(3), 811-819.

Liste des annexes

Annexe 1 : Listes du Matériel et réactifs utilisés

1. Verrerie

- Barreau magnétique.
- Béchers.
- Entonnoirs.
- Eprouvettes de 250, 100 ml, 10 ml.
- Erlen-meyer.
- Fioles graduée : 100ml, 250 ml, 300ml.
- Flacons en verre.
- Micropipettes : 10 μ L ,100 μ l, 200 μ l et 1000 μ l.
- Mortier.
- Papier whatman N° 1.
- Tubes en verre à vice.

2. Réactifs et colorants

- Acétate de sodium.
- Acétone.
- Acide acétique.
- Acide ascorbique.
- Acide chlorhydrique.
- Acide phosphorique à 80%.
- Acide sulfurique.
- Alcool éthylique.
- Bleu de bromophénol.
- Bleu de Coomassie G250.
- Eau distillée.
- Ethanol.
- Ethanol absolu.
- Ethanol pur.
- Chloroforme.

- FeCl₃.
- HCl 1 N.
- HCL pur.
- H₂O₂.
- KOH.
- Propanol.
- Solution de sérum albumine bovine (BSA) à 0,1mg/ml.
- Tris 0,1 M.

Annexe 2 : Préparation de la solution aqueuse de KOH à 10%

- Peser 2 g des cristaux de KOH et ajouter 20 ml d'eau distillée.
- Agiter pendant quelques minutes.

Annexe 3 : Préparation de la solution d'acide sulfurique à 10%

- Prélever 1 ml d'acide sulfurique et ajouter 10 ml d'eau distillée.

Annexe 4 : La composition du réactif de Dragendorff

- Iodure de potassium (KI, 60g), nitrate de bismuth (BiNO₃, 60g), acide acétique glacial (CH₃COOH, 15ml), chlorure de mercure (Hg₂Cl₂, 13.55g), ammoniacque (NH₄OH, 20 ml) et dichlorométhane (CH₂Cl₂, 100 ml).

Annexe 5 : Préparation de la solution alcoolique de KOH

- Peser 1 g de KOH puis ajouter 10 ml d'éthanol
- Agiter pendant quelques minutes.

Annexe 6 : Préparation de la solution HCl à 10%

- Prélever 1 ml de HCl pure et ajouter 10 ml d'eau distillée.
- Agiter pendant quelques secondes.

Annexe 7 : Préparation du tampon tris-HCl à 0,1 M

- Faire dissoudre 0,6 g de la poudre tris dans 50 ml de l'eau distillée.
- Ajuster le pH de la solution qui est au départ basique (PH = 10, 8) par l'adition de solution HCl à 1 N jusqu'à PH = 7, 4.

Annexe 8 : Préparation du réactif de Bradford (100 ml)

- Peser 10 mg de BBCG-250 puis ajouter 5 ml d'éthanol
- Agiter pendant 2 h à l'abri de la lumière
- Ajouter 10 ml d'acide ortho-phosphorique
- Compléter à 100 ml avec d'eau distillée
- Filtrer à l'abri de la lumière et conserver à 4°C pendant 3-4 semaines

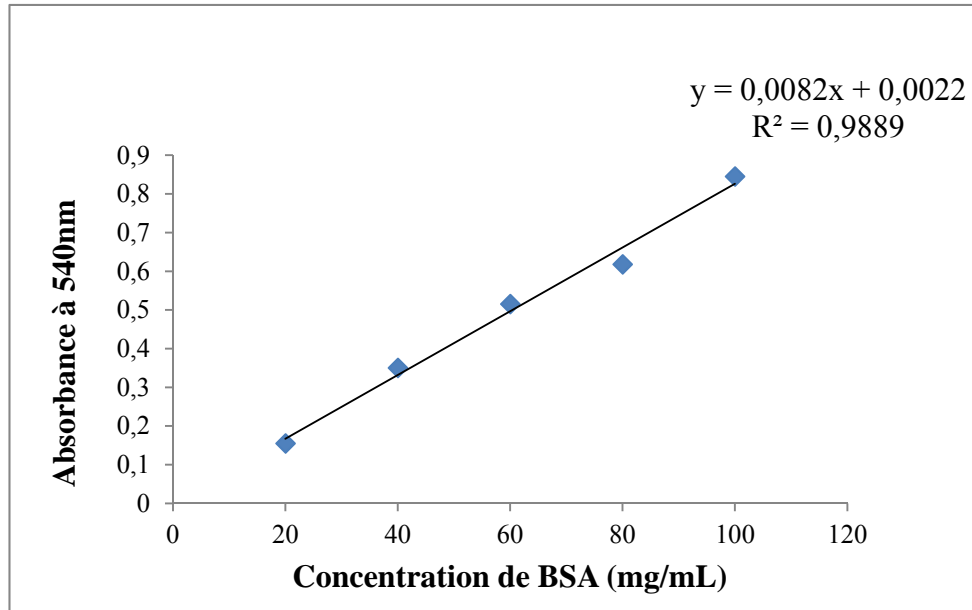
Annexe 9 : Courbe d'étalonnage à base de BSA

- 1.2 mg de BSA mélangé avec 1.2 ml d'eau distillée
- Réalisation d'une série de dilutions (tableau ci-dessous).

Tube	B	1	2	3	4	5
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
[BSA] (µg/µl)	0	20	40	60	80	100
L'eau distillée (ml)	100	80	60	40	20	0
Bradford (ml)	3	3	3	3	3	3

- Agitation puis incubation 10 min (à température ambiante).
- Lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre (595 nm).

Tubes	B	1	2	3	4	5
Absorbances	0	0.197	0.389	0.566	0.692	0.848



Annexe 10 : Préparation de la solution H₂O₂ à 1 M

- Prélever 7.8 ml d'H₂O₂ et compléter jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée.

Annexe 11 : Pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse par l'*Allium sativum*.

Tubes	Contrôle	0	1	2	3	4	5
[c] mg/ml	0	0,25	0,5	1	6	12	24
Do	1.024± 0,018	0,211± 0,058	0,403± 0,012	0,479± 0,031	0,606± 0,051	0,744± 0,019	0,877± 0,004
% Inhibition	0	81.79 ± 0.29	63.04 ± 0.65	53.86 ± 0.46	43.22 ± 0.53	29.74 ± 0.58	16.75 ± 0.2

Annexe 12 : Pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse par *Pinus halepensis* Mill.

Tubes	Contrôle	0	1	2	3	4	5
[c] mg/ml	0	0,25	0,5	1	6	12	24

Do	1.018±	0,341±	0,478±	0,531±	0,646±	0,844±	0,981±
	0,025	0,008	0,039	0,003	0,003	0,006	0,011
% inhibition	0	68.3±	54.84±	49.63±	38.34±	18.89±	5.43±
		0.27	0.61	0.095	0.095	0.22	0.42

Annexe 13 : la courbe de l'acide ascorbique

- Faire dissoudre 4 mg de l'acide ascorbique dans 2 ml PBS.
- Réalisation d'une série de dilutions (tableau ci-dessous).

[c] mg/ml	% inhibition d'hémolyse
2	94,65
1	90,1
0.5	87,96
0.25	86,89
0.125	85,7
0.0625	84,36

Annexe 14 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse du mélange protéique d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill.

Concentrations (%)	Contrôle	50P/50A	75P/25A	25P/75A
Do	1.021±0.003	0.675±0.036	0.746±0.081	0.606±0.027
% inhibition	0	35.49±0.32	29.03±0.63	42.74±0.45

Annexe 15 :

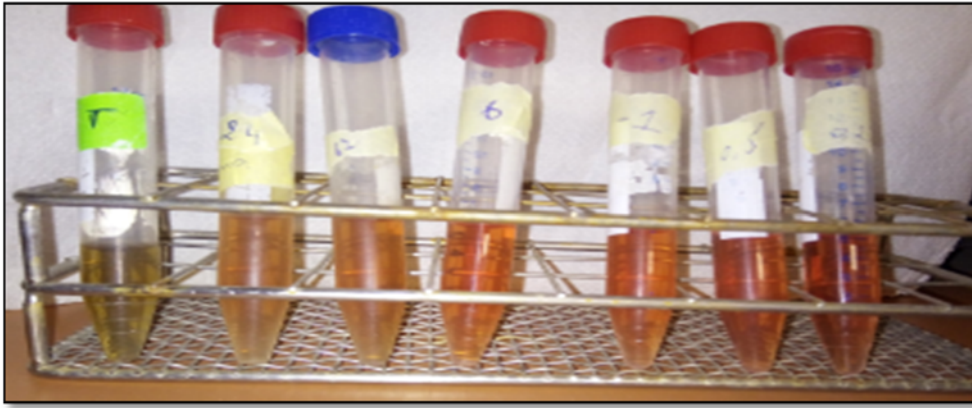


Figure : Photo montrant l'activité anti-hémolytique de l'extrait protéique d'*Allium sativum*. T : témoin , tube 1 : 24 mg/ml ; tube 2 : 12 mg/ml ; tube 3 : 6 mg/ml ; tube 4 : 1 mg/ml ; tube 5 : 0.5 mg/ml ; tube 6 : 0.25 mg/ml d'extrait protéique.

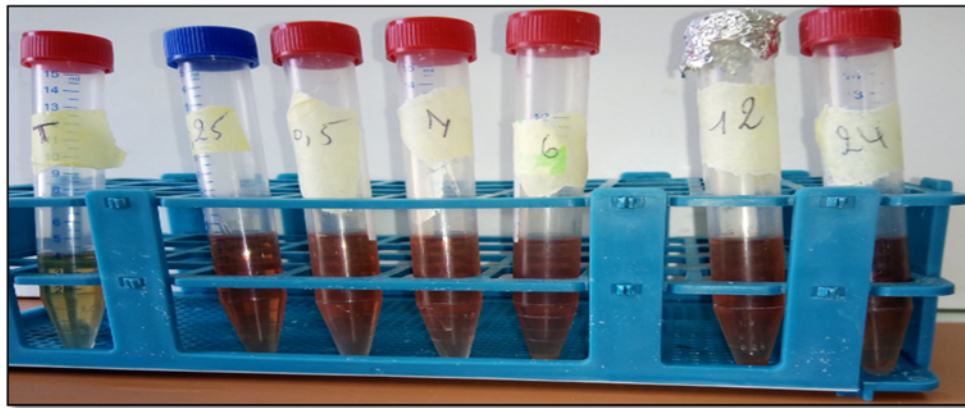


Figure : Photo montrant l'activité anti-hémolytique de l'extrait protéique de *Pinus halepensis* Mill. T : témoin , tube 1 : 0.25 mg/ml ; tube 2 : 0.5 mg/ml ; tube 3 : 1 mg/ml ; tube 4 : 6 mg/ml ; tube 5 : 12 mg/ml ; tube 6 : 24 mg/ml d'extrait protéique.

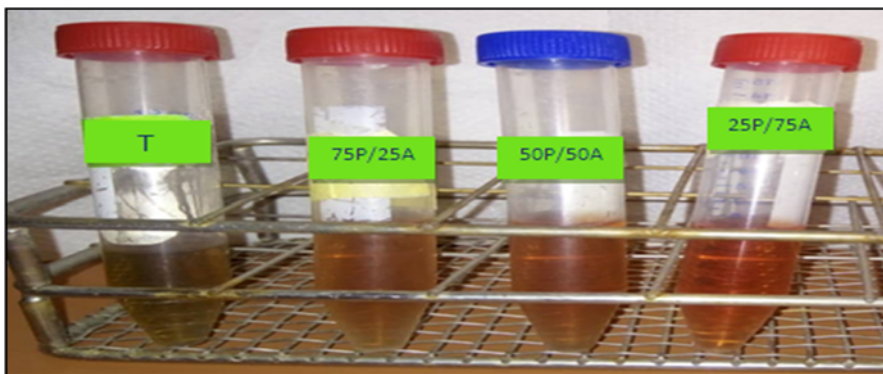


Figure : Photo montrant le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse du mélange protéique d'*Allium sativum* et de *Pinus halepensis* Mill. T : témoin ; A : Ail ; P : Pin d'Alep ; 75 A : 75 % d'extrait protéique d'ail ; 25 P : 25 % d'extrait protéique de pin d'Alep.

Résumé

Cette étude porte sur l'évaluation de l'activité anti-hémolytique in vitro, des protéines totales, obtenus à partir des extraits des gousses d'*Allium sativum* et des graines de *Pinus halpensis* Mill appartenant à la famille Alliaceae et des Pinacées respectivement. Elles sont utilisées largement dans la médecine traditionnelle.

L'analyse phytochimique a permis de révéler la présence des mucilages, des saponosides, des leucoanthocyanes et dans l'extrait d'ail. Tandis qu'il ya la présence des alcaloïdes, des leucoanthocyanes et des coumarines dans l'extrait des graines de pin d'Alep. Pour le dosage de protéines totales, l'extrait des graines de *P. halpensis* Mill a montré la teneur la plus élevée de 356.97 mg/ml ; suivi par le taux protéique de l'extrait des gousses d'*A. sativum* avec 93.51 mg/ml. L'étude de l'activité anti-hémolytique des mêmes extraits sur les érythrocytes humains et en présence d'un générateur d'hémolyse, le H₂O₂ a révélé que le pourcentage le plus significative de l'activité été de 81.79% pour *A. sativum* et de 68.3% pour *P. halpensis* Mill pour une concentration protéique de 0,25 mg/ml. L'inhibition de l'hémolyse du mélange protéique d'*A. sativum* et de *P. halepensis* Mill s'est avérée variable en fonction des concentrations de l'extrait utilisées. Le pourcentage le plus élevé a été enregistré pour l'extrait protéique d'ail (75 %) et (25 %) de pin d'Alep avec 42.74 %.

Mots clés : *Allium Sativum*, *Pinus halepensis* Mill, screening, extraction, protéine, activité anti-hémolytique.

Abstract

This study investigates the evaluation of anti-haemolytic activity in vitro, total proteins, obtained from extracts of *Allium sativum* pods and *Pinus halpensis* Mill seeds belonging to the family Alliaceae and Pinaceae respectively. They are widely used in traditional medicine.

Phytochemical analysis revealed the presence of mucilage, saponosides, leucoanthocyanins and alkaloids in garlic extract. While there is the presence of alkaloids, leucoanthocyanins and coumarins in the extract of Aleppo pine seeds. For the total protein assay, *P. halpensis* Mill seed extract showed the highest level of 356.97 mg / ml; followed by the protein content of the pod extract *A. sativum* with 93.51 mg / ml. The study of the anti-hemolytic activity of the same extracts on human erythrocytes and in the presence of a hemolysis generator, H₂O₂ revealed that the most significant percentage of the activity was 81.79% for *A. sativum* and 68.3% for *P. halpensis* Mill for a protein concentration of 0.25 mg / ml. Inhibition of hemolysis of the protein mixture of *A. sativum* and *P. halepensis* Mill were found to be variable depending on the concentrations of the extract used. The highest percentage was recorded for the protein extract of garlic (75%) and (25%) of Aleppo pine with 42.74%.

Key words: *Allium sativum*, *Pinus halpensis* Mill, Screening, Extraction, protein, anti-haemolytic activity.

ملخص

تبحث هذه الدراسة في تقييم النشاط المضاد للدم في المختبر ، البروتينات الكلية ، التي تم الحصول عليها من مستخلصات قرنة *Allium sativum* وبذور *Pinus halpensis* Mill التابعة لعائلة Alliaceae و Pinaceae على التوالي. تستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي. وكشف التحليل الكيميائي النباتي وجود الصمغ ، السابونوسيدات ، يوكوانثوسيانين والقلويات في مستخرج الثوم. في حين أن هناك قلويدات ، يوكوانثوسيانين والكومارين في مستخلص بذور الصنوبر الحلبي. بالنسبة لفحص البروتين الكلي ، أظهر مستخلص بذور *P. halpensis* Mill أعلى مستوى عند 356.97 ملغم / مل. تليها محتوى البروتين من استخراج جراب. *sativum* مع 93.51 مل / مل. كشفت دراسة النشاط المضاد للانحلال في نفس المستخلصات على كريات الدم الحمراء البشرية وبوجود مولد انحلال الدم، أن H₂O₂ كشفت أن النسبة المئوية الأكثر أهمية للنشاط كانت 81.79 % بالنسبة لـ *A. sativum* و 68.3 % لـ *P. halepensis* Mill لتركيز البروتين بنسبة 0.25 ملغ / مل. تثبيط انحلال الدم من خليط البروتين لـ *A. sativum* و *P. halepensis* Mill كانت متغيرة تبعاً لتركيزات المستخلص المستخدم. سجلت أعلى نسبة لمستخلص بروتين الثوم (75%) و (25%) من الصنوبر الحلبي بنسبة 42.74 %.

الكلمات المفتاحية: *Allium sativum* ، مطحنة *Pinus halpensis* ، الفحص ، الاستخلاص ، البروتين ، النشاط المضاد للتخلل.