



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بو عريريج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم
البيولوجية
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Intitulé

**Evaluation de l'Activité anti-radicalaire de *Pinus halepensis*
Mill**

Présenté par : HOUAIRI Souhila

Soutenu le : 09/07/2019

Devant le jury :

Président : M^{me} FATMI Widad MCB (Univ de Mohamed El Bachir El Ibrahimi)
Encadrant: M^{me} MEZITI Asma MCB (Univ de Mohamed El Bachir El Ibrahimi)
Examineur : M^{me} HIHAT Soraya MAA (Univ de Mohamed El Bachir El Ibrahimi)

Année universitaire : 2018/2019



Remerciements

Avant toute chose je remercie Allah le tout puissant et miséricordieux de m'avoir accordé la force et la patience et courage afin de pouvoir réaliser ce travail.

Un remerciement infiniment et spécial pour mon encadreur Mme MEZITI. A de m'avoir facilitée la réalisation de ce mémoire, en mettant à notre disposition tout ce dont j'ai besoin et pour les conseils avisés, sa disponibilité au quotidien, ses orientations, ses encouragements et son aide précieuse tout au long du travail.

Je remercie chaleureusement Mme FATMI Widad de m'avoir fait l'honneur de présider le jury, de ce mémoire.

Mes sincères remerciements vont également à Mme HICHAT Soraya d'avoir accepté de juger et d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier aussi l'ensemble du personnel du service de laboratoire.

Enfin, mon remerciement s'adresse à tous les enseignants, Je remercie aussi ma famille et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.



MERCI POUR TOUT

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

À

À la lumière de mes yeux, et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude pour son amour son soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

À

Mon très cher Père: Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Que dieu vous bénisse et vous accorde une longue vie pleine de sante et de bonheur.

À

Mes chers grands parents que dieu les protèges.

À

Mes très chers frères : Said et Nacir et Yakoub.

À

Mon marie Daoud et sa famille.

À

Mes tantes et mes oncles, ainsi que toute ma famille.

À

Ma meilleure amie Kahina.

À

Tous ceux qui j'aime et qui m'aiment.

Souhila

Résumé

Vu la diversité et la gravité des maladies qu'induit le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress oxydant et ses pathologies. Le *Pinus halepensis* Mill est l'une des plantes médicinales traditionnelles qui possède de nombreuses propriétés biologiques. L'objectif du présent travail est de déterminer les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, ainsi que le potentiel antioxydant de l'extrait aqueux (EAq) et l'extrait méthanolique (EMe) d'écorce de *Pinus halepensis*. L'extrait méthanolique donne un meilleur rendement (13,52%) par rapport à l'extrait aqueux (2,38 %). L'analyse quantitative des polyphénols totaux et de flavonoïde en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium révèle la présence de quantités importantes de polyphénols et de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique (714.66 µg EAG/mg d'extrait et 19.75 µg EQ/mg d'extrait) en comparaison avec l'extrait aqueux (410.66 µg EAG/mg d'extrait et 5.75µgEQ/mg d'extrait).L'évaluation de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH, montre que l'extrait méthanolique possède un pouvoir antiradicalaire puissant ($IC_{50} = 0.02 \mu\text{g/ml}$) supérieur à celui de l'extrait aqueux ($IC_{50} = 0.08 \mu\text{g/ml}$) et de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0.06 \mu\text{g/ml}$) ; ces résultats montre que l'activité importante exercée par l'extrait méthanolique s'expliquent probablement par sa richesse en polyphenols et en flavonoïdes.

Mots-clés : *Pinus halepensis*, Stress oxydant, Polyphénols, Flavonoïdes, Activité antiradicalaire.

Abstract

Given the diversity and severity of the diseases that oxidative stress induces, several teams of researchers have invested in the search for new antioxidants to fight against oxidative stress and its pathologies. *Pinus halepensis* Mill is one of the traditional medicinal plants that have many biological properties. The objective of the present work is to determine the contents of phenolic compounds and flavonoids, as well as the antioxidant potential of the aqueous extract (EAq) and the methanolic extract (EMe) of *Pinus halepensis* bark. The methanolic extract gives a better yield (13.52%) compared to the aqueous extract (2.38%). The quantitative analysis of total polyphenols and flavonoid using the Folin-Ciocalteu method and aluminum trichloride reveals the presence of significant quantities of polyphenols and flavonoids in the methanolic extract (714.66 μg EAG / mg of extract and 19.75 μgEQ / mg of extract) in comparison with the aqueous extract (410.66 μg EAG / mg of extract and 5.75 μgEQ / mg of extract). The evaluation of the antiradical activity vis-à-vis the DPPH radical, shows that the methanolic extract has a powerful antiradical power ($\text{IC}_{50} = 0.02 \mu\text{g} / \text{ml}$) greater than that of the aqueous extract ($\text{IC}_{50} = 0.08 \mu\text{g} / \text{ml}$) and ascorbic acid ($\text{IC}_{50} = 0.06 \mu\text{g} / \text{ml}$); these results show that the important activity exerted by the methanolic extract is probably explained by its richness in polyphenols and flavonoids .

Key words: *Pinus halepensis*, flavonoids, polyphenols, antiradical activity, oxidative stress

نظرا لتنوع وشدة الأمراض التي يسببها الإجهاد التأكسدي ، فقد استثمرت عدة فرق من الباحثين في البحث عن مضادات الأكسدة الجديدة لمكافحة الإجهاد التأكسدي وأمراضه. الصنوبر الحلبي هي واحدة من النباتات الطبية التقليدية التي لها العديد من الخصائص البيولوجية.الهدف من العمل الحالي هو تحديد محتويات المركبات الفينولية والفلافونويدات ، إمكانية مضادات الأكسدة في المستخلص المائي (EAq) والمستخلص الميثانولي (EMe) .

يعطي المستخلص الميثانولي عائدا أفضل (13.52) (2.38) . يكشف التحليل الكمي للبوليفينول والفلافونويد باستخدام طريقة Folin-ciocalteu وثلاثي كلوريد الألمنيوم عن وجود كميات كبيرة من البوليفينول والفلافونويدات في المستخلص الميثانولي(714.66ميكروغرام EAG / 19.75 ميكروغرام EQ/ (410.66 ميكروغرام EAG / 5.75 ميكروغرام EQ /) . يُظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة مقابل جذري DPPH المستخلص الميثانولي لديه قوة أذينية قوية (IC50 = 0.02 ميكروغرام /) (IC50 = 0.08) ميكروغرام /) وحمض الأسكوربيك (IC50 = 0.06 ميكروغرام /) .توضح هذه النتائج النشاط الهام لخلاصة الميثانول يفسره محتواه العالي من البوليفينول والفلافونويدات.

الكلمات المفتاحية : البوليفينول , الفلافونويد , الإجهاد التأكسدي.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Radicaux libres, stress oxydant et antioxydants.....2

I.1. Espèces réactifs oxygénés et radicaux libres.....2

I.1.1. Principales espèces réactifs oxygénés3

I.1.1.1. L'anion superoxyde.....3

I.1.1.2. Le peroxyde d'hydrogène.....4

I.1.1.3. Le radical hydroxyle.....4

I.1.1.4. L'oxygène singulier.....4

I.1.1.5. Le monoxyde d'azote.....5

I.1.2. Sources des espèces réactifs oxygénés5

I.1.2.1. Endogène.....5

I.1.2.2. Exogène.....6

I.1.3. Principales cibles des espèces réactives oxygénés.....7

I.1.3.1. Les lipides.....7

I.1.3.2. Les protéines.....8

I.1.3.3. Les acides nucléiques(ADN).....9

I.2. Le stress oxydant et ses implications pathologiques.....10

I.3. Les antioxydants11

I.3.1. Mécanisme d'action des antioxydants.....13

CHAPITRE II : Les composés phénoliques (polyphénols).....14

II.1. Classification des polyphénols.....14

II.1.1. Les flavonoïdes.....16

CHAPITRE III : Présentation de la plante (*Pinus halepensis* Mill).....18

III.1. Généralité.....18

III.2. Classification de *Pinus halepensis* Mill.....18

III.3. Aspect botanique de *Pinus halepensis* Mill.....19

III.4. Composition chimique du genre *Pinus*.....20

III.5. Usage et activité biologique.....20

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES.....	21
I.1. Matériel.....	21
I.1.1. Appareillage et produits chimique.....	21
I.1.2. Matériel végétale :	21
I.1.2.1. Récolte de la plante.....	21
I.1.2.2. Séchage et Broyage de la plante.....	21
I.2. Méthodes.....	21
I.2.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	21
I.2.2. Préparation de l'extrait méthanolique.....	21
I.2.3. Détermination du rendement d'extraction.....	22
I.2.4. Evaluations des taux des composés phénoliques.....	22
I.2.4.1. Dosage des phénols totaux	22
I.2.4.1.1. Principe.....	22
I.2.4.1.2. Mode opératoire.....	23
I.2.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	24
I.2.4.2.1. Le principe.....	24
I.2.4.2.2. Mode opératoire.....	24
I.2.5. Etude de l'activité anti-radicalaire : test de DPPH	25
I.2.5.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	25
I.2.5.1.1 Le principe.....	25
I.2.5.1.2. Mode opératoire.....	26
CHAPITRE II : RESEULTATS ET DISCUSSIONS	27
II.1. Préparation des extraits.....	27
II.2. Analyse des extraits de <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	28
II.2.1. Dosage des polyphénols totaux	28
II.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	29
II.3. Activité anti-radicalaire.....	31
II.3.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	31
CONCLUSION	35
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet.

Abs : Absorbance.

AlCl_3 : Trichlorure d'aluminium ou chlorure d'aluminium.

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl.

EAG : Equivalent d'acide gallique.

EAq : Extrait aqueux d'écorce de *Pinus halepensis* Mill.

EC: Equivalent de catéchine.

EMe : Extrait méthanolique d'écorce de *Pinus halepensis* Mill.

EQ: Equivalent de quercétine.

ERN : Espèces réactives de Nitrogène.

ERO : Espèce réactive d'oxygène.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion disulfure.

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée.

IC_{50} : Concentration inhibitrice a 50%.

Na_2CO_3 : Carbonate de sodium.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

NADPH : Nicotinamide adinin dinucléotide phosphate.

NO^\bullet : Monoxyde d'azote.

NOS : Nitrique Oxyde Synthase.

O_2^- : Anion superoxyde.

OH^\bullet : Radical hydroxyle.

$\text{ONOO}^{\bullet-}$: Peroxynitrites.

HO_2^\bullet : Radical perhydroxyle

RL : Radicale Libre.

RO^\bullet : Radical alkoxyde.

ROO^\bullet : Radical peroxyde.

ROOH : Hydro peroxyde Organique.

Sn : Etain.

SOD : Superoxyde dismutase.

UV : Ultra violet.

Liste des figures :

Figure 01 : Les réactions et les produits de l'anion superoxyde.....	3
Figure 02 : Formation des espèces réactives par divers processus.....	6
Figure 03 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives.....	7
Figure 04 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés.....	8
Figure 05 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	10
Figure 06 : Structure de base des flavonoïdes.....	16
Figure 07 : Arbres de <i>Pinus halepensis</i>	19
Figure 08 : <i>Pinus halepensis</i> Mill (arbre, feuilles, cône).....	19
Figure 09 : Macération	22
Figure 10 : Réaction du chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes.....	24
Figure11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	25
Figure 12 : Dosage des polyphénols dans les extrais d'écorce de <i>Pinus halepensis</i>	28
Figure 13 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	28
Figure 14 : Dosage des flavonoïdes dans les extrais d'écorce de <i>Pinus halepensis</i>	30
Figure 15 : Droite d'étalonnage de la quercétine.....	30
Figure 16 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en présence de l'extrait méthanolique.....	31
Figure 17 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en présence de l'extrait aqueux.....	32
Figure 18 : Activité anti-radicalaire de l'acide ascorbique.....	32
Figure 19 : IC ₅₀ de l'extrait aqueux et méthanolique et le standard (acide ascorbique).....	33

Liste des tableaux

Tableau I : Espèces oxygénés réactives et leur structure chimique.....	2
Tableau II : Relations entre les maladies et le stress oxydant.....	11
Tableau III: Les systèmes de défense antioxydant.....	12
Tableau IV: Mécanisme d'action de quelque antioxydant.....	13
Tableau V: Classes des composés phénoliques.....	15
Tableau VI: Principales classes des flavonoïdes.....	17
Tableau VII : Aspects, couleurs et rendements de extraites de <i>Pinus halepensis</i>	27



Introduction

Introduction

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives oxygénées (ERO). Aux doses faibles, les ERO sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal. La surproduction des ERO au delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies (**Meziti, 2009**).

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme (**Meziti, 2009**).

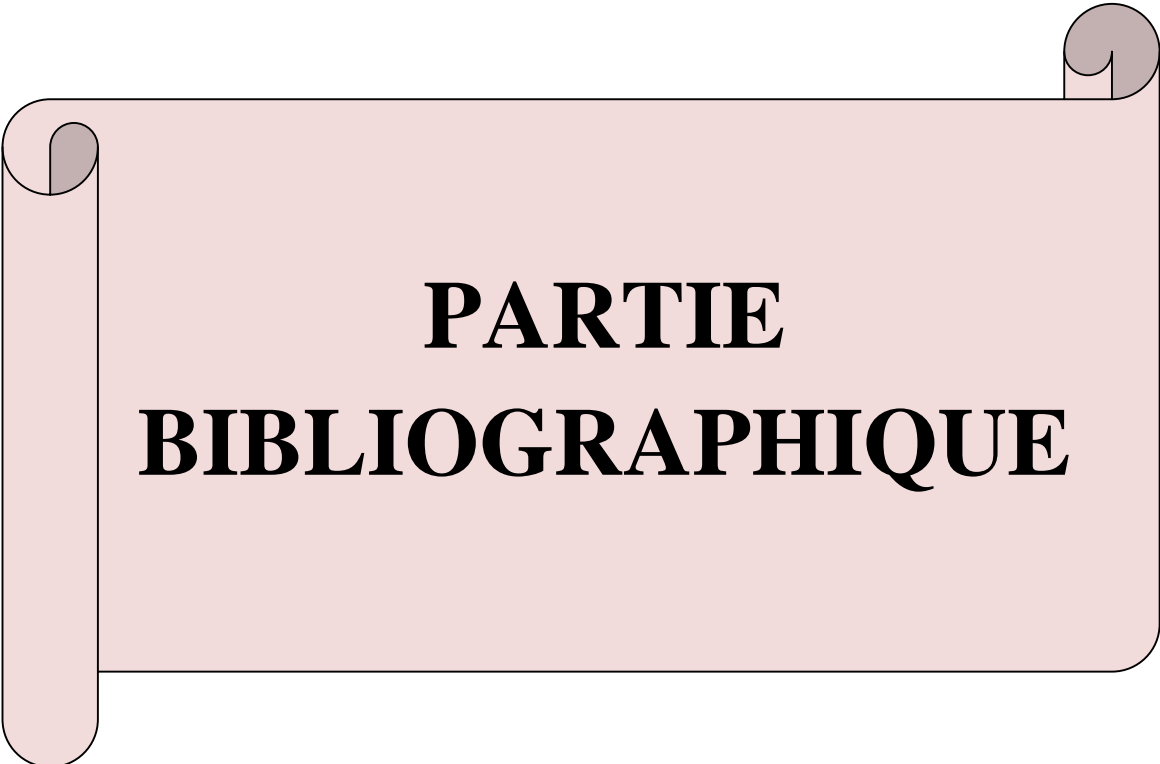
Cependant, les antioxydants synthétiques sont susceptibles de causer des effets indésirables, de ce fait, les scientifiques se tournent vers les soins à base de plantes qui sont moins agressifs et bien acceptés par l'organisme (**Iserin, 2001 ; Adida et al., 2016**).

Les plantes médicinales sont une source intéressante de nouvelles molécules candidates pour la lutte contre différentes pathologies, grâce à leurs métabolites secondaires. En particulier, les composés phénoliques qui font l'objet de nombreuses études en raison de leurs nombreuses propriétés biologiques et leur impact bénéfique sur la santé humaine (**Richard et al., 2014**).

Pinus halepensis ou pin d'Alep a fait l'objectif de notre étude du fait de sa large répartition surtout dans le bassin méditerranéen, ainsi que les propriétés thérapeutiques de ses huiles essentielles. Le Pin d'Alep est largement utilisé en médecine traditionnelle pour réduire l'hypercholestérolémie, traiter les infections des voies respiratoires. Il possède aussi des effets antimicrobiens et antifongiques (**Cheikh-Rouhou et al., 2006 ; Cheikh-Rouhou et al., 2008 ; Lucienne, 2010; Berroukche et al., 2014**).

Notre travail a pour but essentiel la recherche des molécules à effet anti-radicalaire. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Préparation des extraits méthanolique et aqueux de l'écorce de la plante *Pinus halepensis*.
- Evaluation de la teneur en polyphénols totaux, et en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique de *Pinus halepensis*.
- Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux et méthanolique de *Pinus halepensis* par les tests de DPPH.



**PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I :
Radicaux libres, stress
oxydant et
antioxydants

I. Radicaux libres, stress oxydant et antioxydants

I.1. Espèces réactifs oxygénés et radicaux libres

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont une famille d'entité chimique qui regroupent des dérivés radicalaires et des dérivés non radicalaires (**Goudable et Favier, 1997**). Les ERO susceptibles de former dans la cellule sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau I : Espèces oxygénés réactives et leur structure chimique. (**Goudable et Favier, 1997**)

Type	Radical libres	Structure chimique
Dérivés radicalaires	Radical hydroxyle	OH \cdot
	Radical hydroperoxyde	HOO \cdot
	Radical peroxyde	ROO \cdot
	Radical alcoxyle	RO \cdot
Dérivés non radicalaires	Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
	Peroxynitrite	ONOO \cdot
	L'oxygène singulier	¹ O ₂

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte (**Carange, 2010**). Il est caractérisé par un temps de demi-vie extrêmement court (10^{-9} - 10^{-3} s). Il peut se former soit par la réaction redox (gain ou perte d'un ou de plusieurs électrons), soit par la fission homolytique (rupture de la liaison covalente par laquelle chaque atome possède un électron) (**Koechlin-Ramonatx, 2006**).

Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres impliqués ont leur électron célibataire sur l'oxygène ou sur l'azote. Les radicaux primaires sont soit des dérivés de l'oxygène, on parle d'espèces réactives de l'oxygène ou ERO, soit des dérivés de l'azote, on parle d'espèces réactives de l'azote ou ERN (monoxyde d'azote NO \cdot , peroxydinitrites ONOO \cdot).

D'autres espèces réactives non radicalaires peuvent entraîner la formation de radicaux (oxygène singulet ¹O₂, peroxyde d'hydrogène H₂O₂).

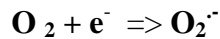
Les radicaux secondaires sont issus de la réaction des radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule (Delattre, 2007).

I.1.1. Principales espèces réactifs oxygénés (ERO)

Les espèces réactives oxygénées (ERO) incluant les radicaux libres comme le radical hydroxyl (OH^\bullet), le radical superoxyde (O_2^\bullet) et sa forme protonnée (HO_2^\bullet), le radical peroxy (ROO^\bullet) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) sont des molécules hautement réactives (Chu *et al.*, 2010).

I.1.1.1. L'anion superoxyde

Est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (Harman, 2000)



L'anion superoxyde est généré par différents systèmes enzymatiques notamment des oxydases (ex : NADPH oxydase dans la membrane lipidique et cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire mitochondriale) (Gutteridge et Halliwell, 1993).

L'anion superoxyde est produit en grande quantité par les phagocytes pour tuer les pathogènes invasifs (Fridovich, 1974). Il possède une durée de vie relativement courte et est converti assez rapidement en différents produits (figure1).

Ce radical à peu de cibles privilégiées (les superoxydes dismutases, le cytochrome C, l'ascorbate), il réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour fournir le radical hydroxyle en présence de Fe (III) (Hool, 2006).

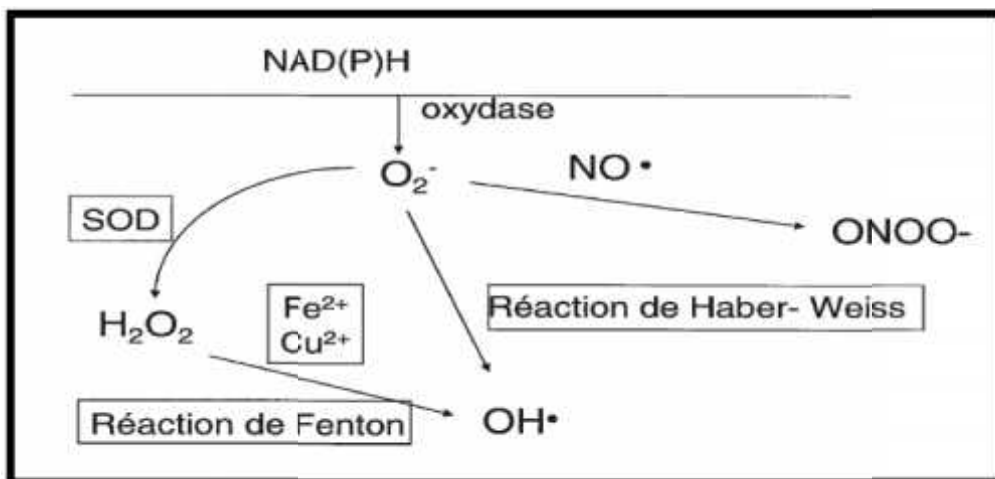


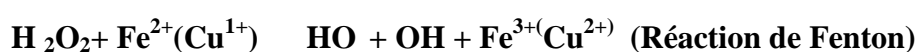
Figure 01 : Les réactions et les produits de l'anion superoxyde. (Fridovich et Mccord, 1969).

I.1.1.2. Le peroxyde d'hydrogène

Il se forme par dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ sous l'action d'une enzyme : le superoxyde dismutase (SOD).



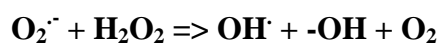
Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'est pas un radical libre, et présente donc une plus grande stabilité par rapport aux les radicaux libres (**Desmier, 2016**). Cependant, il peut générer des radicaux hydroxyles HO^{\cdot} en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} ou de Cu^+ selon la réaction de Fenton ou Haber-Weiss (**Han et al., 2001**).



Le peroxyde d'hydrogène à une demi-vie physiologique relativement longue de quelques secondes et traverse aisément les membranes biologiques. Il peut aussi se lier temporairement à des protéines, ce qui augmente sa distance possible de diffusion (**Schubert et Wilmer, 1991**).

I.1.1.3. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$) est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques. C'est le radical le plus dangereux dans l'organisme. Il peut se former par réaction du peroxyde d'hydrogène avec un ion ferreux (réaction de Fenton) ou par réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde (réaction de Haber-Weiss) (**Halliwell et al., 1984**) (**Vergely et al., 2003**).



De par sa demi-vie courte (environ une nanoseconde), et à la faible distance qu'il peut parcourir (moins de dix nanomètres), il diffuse peu et agit directement sur le site de production (**Han et al., 2001**).

I.1.1.4. L'oxygène singulier

L'oxygène singulier (1O_2) est la forme excitée de l'oxygène moléculaire ou $O_2^{\cdot-}$, obtenu par appariement des deux électrons célibataire de l' O_2 . Selon la réaction:



- Il peut sous l'action des UV d'oxyder de nombreuses molécules. (**Seifried, 2007**).

I.1.1.5. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO^\bullet) est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (**Fang et al., 2002**).

- Il est susceptible de réagir avec d'autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes telles que l' O_2^\bullet pour donner le (ONOO^\bullet). (**Dellater et al., 2003**).



I.1.2. Sources des espèces réactives oxygénées

Les ERO sont produit par deux sources endogènes et exogènes (**Valko et al., 2007**).

I.1.2.1. Endogènes

Dans la cellules, de nombreux systèmes enzymatiques sont capables de générer des oxydants : (**Salvayre et al., 2003**) (**Figure 02**) :

- Les NAD(P)H oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent O_2^\bullet en utilisant NADH ou NADPH comme substrat. (**Valko et al., 2007**).

- La xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des ERO (particulièrement O_2^\bullet et H_2O_2), lors de l'ischémie/reperfusion. (**Valko et al., 2007**).

- Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par les cyclooxygenases, soit par les lipooxygenases (métallo-enzymes à fer), pour former entre autre des hydroperoxydes qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation. (**Valko et al., 2007**).

- De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries par voie enzymatique en molécule non toxique comme H_2O . Cependant, il peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde O_2^\bullet . Cet anion n'est pas le radical le plus délétère, cependant il peut donner naissance comme indiquée précédemment à des espèces beaucoup plus réactives comme le radical hydroxyle HO^\bullet . (**Valko et al., 2007**).

- Une production de peroxyde (O_2^\bullet et H_2O_2) à lieu aussi dans le peroxysome lors de l'ischémie/reperfusion. (**Favier, 2006 ; Leverve, 2009**).

- Les radicaux libres peuvent également être produits lors de la défense antibactérienne. Les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles...) activées pendant la réaction inflammatoire, vont libérer un anion superoxyde O_2^\bullet .

_ La régulation des fonctions cellulaires létales telle que la mort cellulaire programmée (apoptose). fait appelle aussi à la production endogènes des radicaux libre (**Pincemail, 2002 ; Valko et al., 2006**).

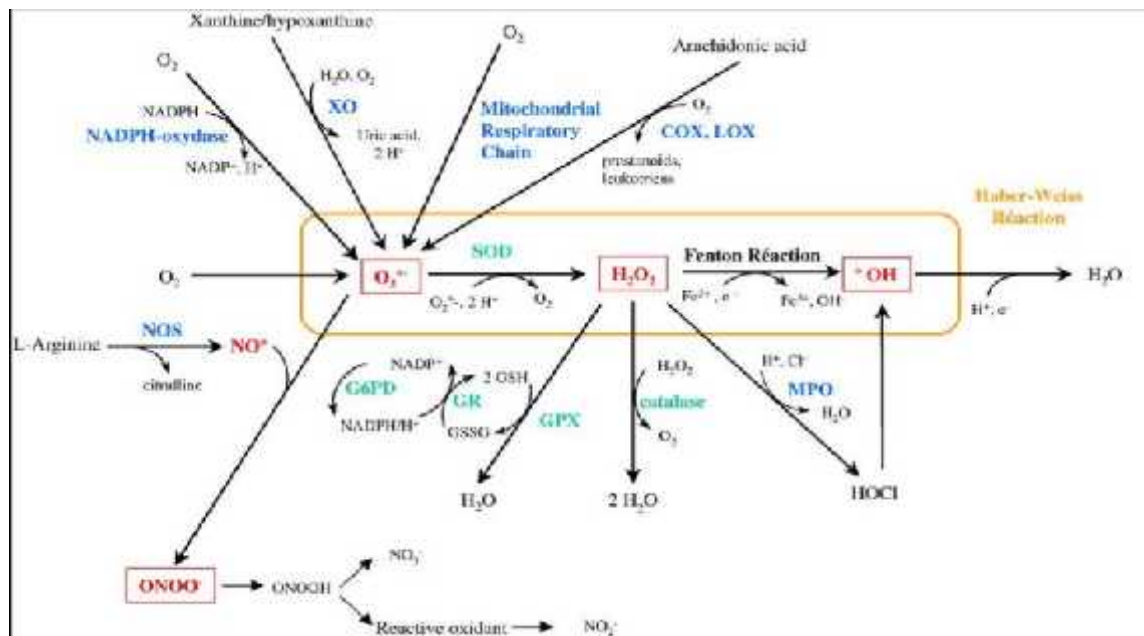


Figure 02 : Formation des espèces réactives par divers processus (Margail et al., 2005).

I.1.2.2. Exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents extérieurs capables de donner naissance à des espèces réactives oxygénées (**Favier, 2003**).

Elles sont générées sous l'effet des facteurs environnementaux, des polluants divers, des radiations (UV, rayons gamma), certains produits chimiques, ainsi que des contamination par des pesticides ou des métaux lourds ou carences nutritionnelles (**Rao et al., 2011**).

- Les radiations X ou gamma peuvent par différents mécanismes faire apparaitre des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux.

- Les rayonnements UV sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation des photosensibilisants. Une large variété de xenobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, etc...) et médicaments (antibiotiques, anticancéreux, etc...) peuvent contribuer à la production des EOR qui se forment comme un des produits de leur métabolisme (**Valko et al., 2007**).

Il a aussi été montré que l'ingestion d'alcool pouvait être à l'origine de la production de radicaux libres. Ils sont produits au cours de l'oxydation de l'acétaldéhyde. Mais aussi certains médicaments anticancéreux, antibiotiques (Favier, 2003 ; Mohammadi, 2005).

I.1.3. Principales cibles des espèces réactives oxygénées (ERO)

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides (Laight *et al.*, 2000).

La présence d'espèces activées de l'oxygène à des conséquences potentiellement graves pour la cellule (Figure 03). (Costa et Moradas-Ferreira, 2001).

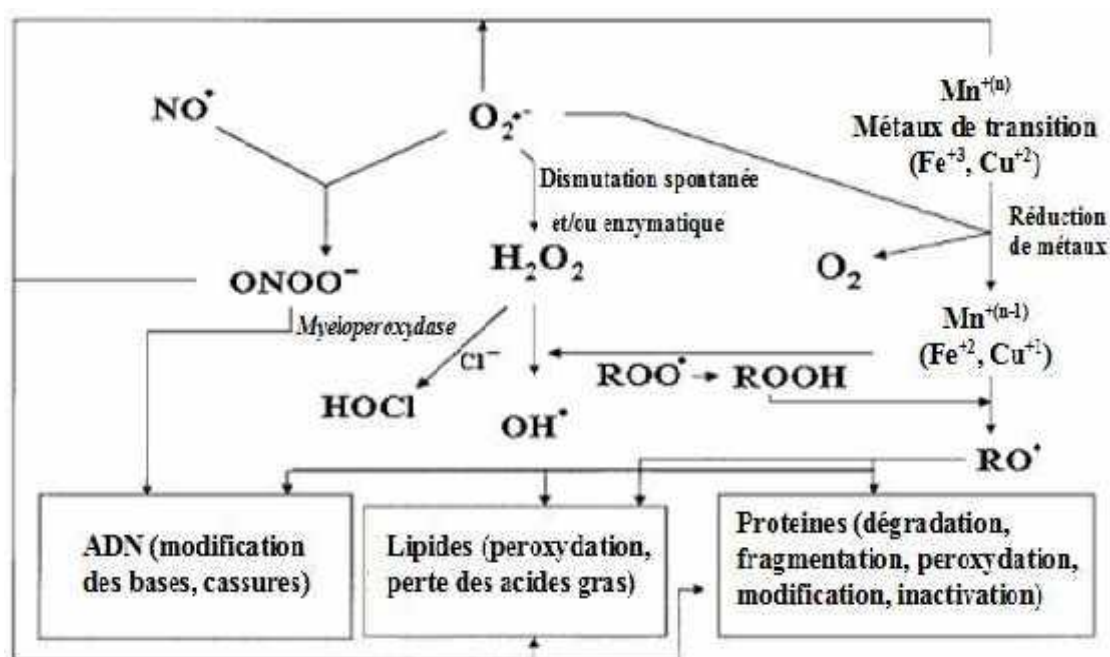


Figure 03 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives (Kohen et Nyska, 2002).

I.1.3.1. Les lipides

Les lipides, en particulier les acides gras polyinsaturés, sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (Figure 04). Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Gardès *et al.*, 2003).

Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonaldaldéhyde ou l'hydroxynonanal (**Gardès et al., 2003**).

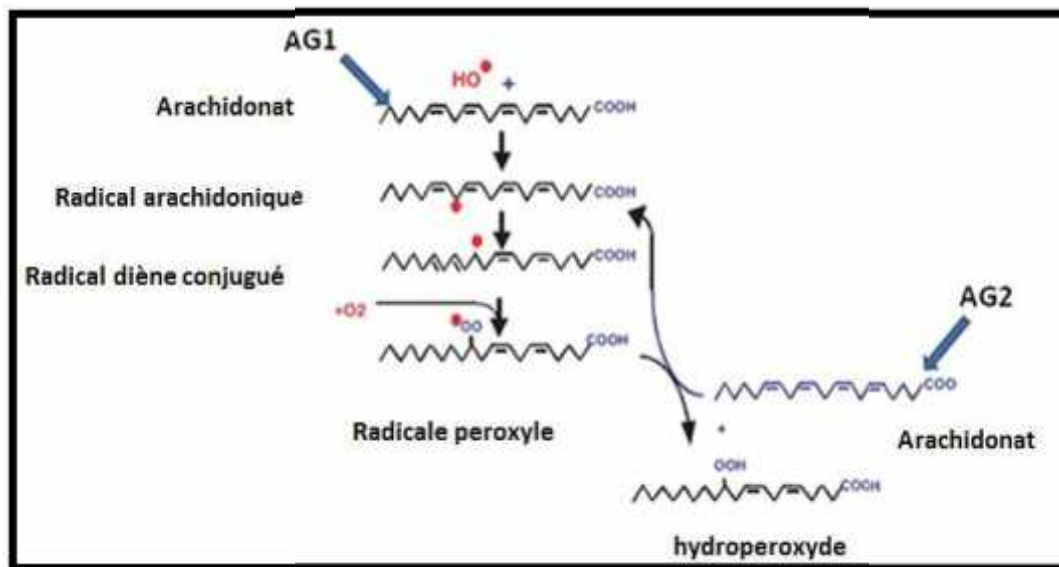


Figure 04: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (**Bennamara., 2017**).

I.1.3.2. Les protéines

La fonction et l'activité des protéines peuvent être affectées par altération de leur structure complexe, en particulier par oxydation. En effet, les protéines peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec altération de leurs structures primaires et secondaires. En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues vulnérables à l'action des protéases. Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines. Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés. L'histidine, la proline, l'arginine et la lysine sont particulièrement prédisposées à cette attaque (**Levine, 2002**).

Les ERO oxydent les résidus amino-acides responsables des activités des protéines, agissent sur les centres Fe-S de ces protéines ou sur les métaux qu'elles complexent. De cette manière, elles altèrent les structures des protéines, entre autres en les dimérisant, et perturbent leurs fonctions (**Di Simplicio et al., 1991 ; Hunt et Wolff, 1991 ; Thannickal et Fanburg, 2000**).

- les radicaux libres peuvent agir sur les protéines, surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) (enzyme, protéines de transport...). Elles peuvent aussi subir des réticulations, notamment par formation de pont bi-tyrosines, soit par coupure ou modification selon le type d'agression (**Pasquier, 1995 ; Christelle, 2006**).

_ Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules (**Favier, 2003**).

I.1.3.3. Les acides nucléiques(ADN)

Les espèces réactives, et plus particulièrement le radical hydroxyle (HO[•]), peuvent induire des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation.

Ces altérations sont souvent à l'origine des phénomènes de mutagénèse, carcinogénèse ou encore de vieillissement prématuré (**Valko et al., 2007**).

Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH[•] peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténares, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. La peroxydation lipidique génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés (**Favier, 2003**).

Le radical [•]OH s'additionne sur les doubles liaisons de ces bases généralement en C5 ou C8 et les oxyde. Un taux élevé de 8-oxo-guanine est un des principaux marqueurs d'agression oxydante dans l'ADN (**Gardès-Albert et al. 2003**).

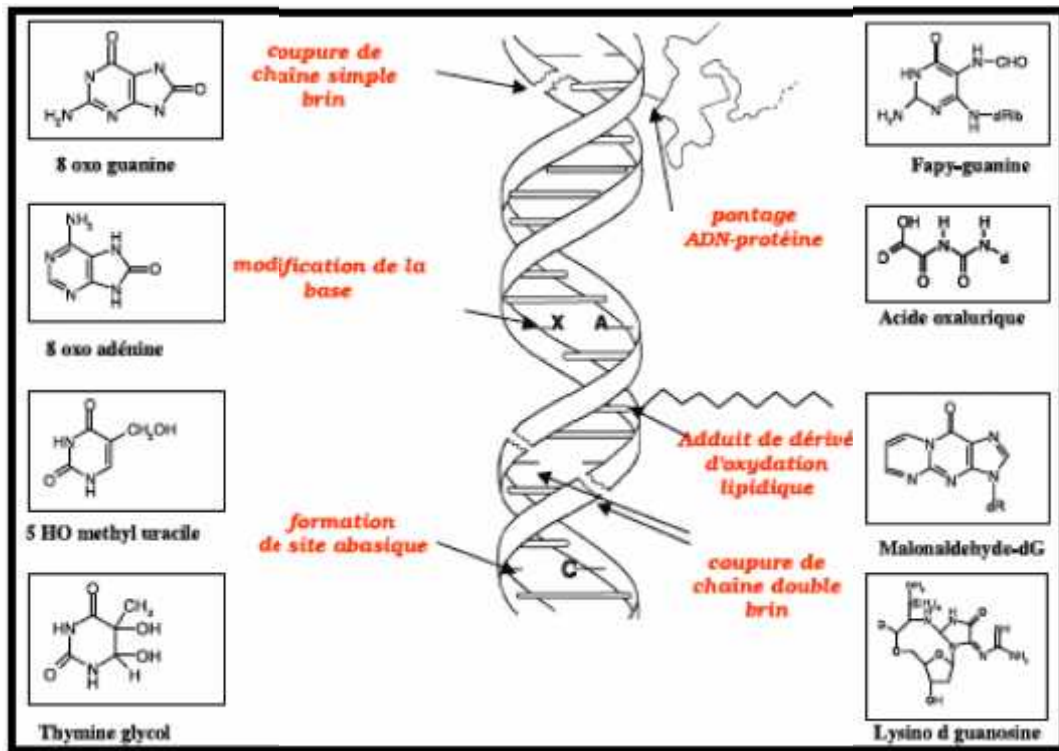


Figure 05 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier 2003).

I.2. Le stress oxydant et ses implications pathologiques

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre de la balance oxydants / antioxydants en faveur des oxydants, entraînant des dommages cellulaires (Atamer et al., 2008). Ce phénomène est associé à une libération massive de radicaux libres (Favier, 2003). Ce stress peut avoir diverses origines : mauvaise alimentation, phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus et habitudes de vie inadéquates (tabagisme, consommation excessive d'alcool,...etc.) (Pincemail et Defraigne, 2004).

Le stress oxydatif est lié à plusieurs pathologies telles que : vieillissement, cancer, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, diabète, ostéoporose, arthrose, cataracte, athérosclérose (Scalbert et Faradet, 2006).

Tableau II : Relations entre les maladies et le stress oxydant (**Favier, 2006**).

Type de stress oxydant	La maladie
<p align="center">Maladies dues à une production insuffisante d'insuffisante de radicaux libres</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Agranulomatose septique - Psoriasis
<p align="center">Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Cancers - Auto-immunité - dégénérescence musculaire - Sclérose latérale amyotrophique - Photo-vieillessement - Photosensibilisation - Hémochromatose
<p align="center">Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Maladie d'Alzheimer - Stérilités masculines - Maladies virales : EBV, HVB - Rhumatismes - Athérome - insuffisance respiratoire

I.3. Les antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Berger, 2006**).

On divise les antioxydants en deux grandes classes : les antioxydants endogènes (enzymatiques) et les antioxydants exogènes (non enzymatiques), selon qu'ils soient produits ou non par l'organisme. (**Baba et McGrath, 2008**) (**Tableau III**).

Tableau III : Les systèmes de défense antioxydant (**Parihar et al., 2008**) ; (**Favier, 2003**).

Système enzymatique	
Supéroxyde dismutase (SOD)	- Catalyse la dismutation de deux $O_2^{\cdot-}$ et deux H^+ en H_2O_2 . Suivant la réaction : $2H^+ + 2O_2^{\cdot-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ - Comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont l'activité est dépendante de la localisation et les apports nutritionnels en cuivre et a un moindre degré en zinc.
Catalase	-Transforme le H_2O_2 en simple molécule d'eau. Comme suite : $2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2$ -Il est lié au NADPH dans les peroxysomes qui la protège et améliore son activité et détruit le H_2O_2 .
Glutathion Peroxydase	- Elle se trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries, est fonctionné en présence de glutathion réduit. $ROOH+2GSH \longrightarrow ROH+GSSH+ H_2O$
Système non enzymatique	
Vitamine C	- C'est un piègeur de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , et 1O_2 , protège les biomembranes et les lipoprotéines, régénère la vitamine E.
Vitamine E	- protège les cellules contre les dommages associés aux RL (inhibe la peroxydation lipidique).
β-carotène	- C'est un précurseur de la vitamine A, neutralise l' 1O_2 et le radical peroxyde.
Glutathion	- C'est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine et joue un rôle dans la protection des lipides, des protéines et l'ADN contre l'oxydation.
Oligoéléments	- Zn, Cu, Mg, Sn et Fe jouent le rôle des cofacteurs pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydants.
Polyphénols	- Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les RL en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. ils peuvent réagir avec ERO et ERN. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité de chélater les métaux ioniques et inhiber les enzymes impliquées dans la production de RL.

I.3.1. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition le **tableau IV (Favier, 2006)**.

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras.

Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (**Yaacoub, 2009 ; Hellal, 2011**).

Tableau IV : Mécanisme d'action de quelque antioxydant (**Yaacoub, 2009 ; Hellal, 2011**).

	Nature	Mode d'action
Défenses non enzymatiques	Vitamine E	Neutralise les radicaux libres.
	Vitamine C	Participe aux réactions d'oxydoréduction.
	Béta carotène	Fixation des métaux de transition.
Défenses enzymatiques.	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde.
	Catalase	Métabolise H ₂ O ₂
	Glutathion peroxydase	Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydroperoxydes.

CHAPITRE II :

Les composés phénoliques

II. Les composés phénoliques (polyphénols)

Les polyphénols sont des molécules naturelles issues du métabolisme secondaire des végétaux. Ils sont produits dans tous les organes de la plante, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ces composés sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Les principales sources en polyphénols sont les fruits et légumes, les céréales et les légumes secs mais également certaines boissons (vin, thé, café, jus de fruits). (**Brat *et al.*, 2006 ; Makhloufi, 2013**).

La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou de plusieurs noyaux aromatiques auxquels sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester) (**Moussa, 2011**).


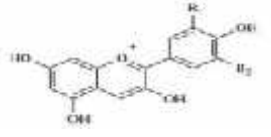
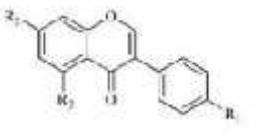
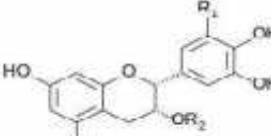
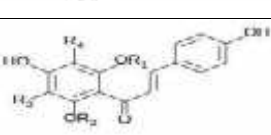
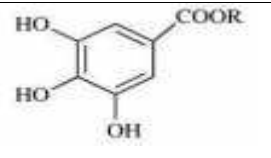
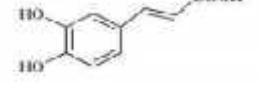
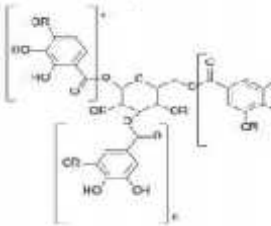
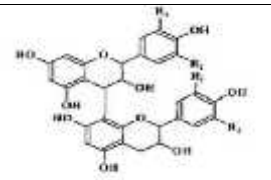
Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (**Crozier *et al.*, 2011**).

Ils sont impliqués dans diverses activités physiologiques et écologiques et ils ont un rôle dans la lutte contre diverses maladies (cardiovasculaires, inflammatoires, cancéreuses et diabète, etc.) (**Khoddami *et al.*, 2013**).

II.1. Classification des polyphénols

Plus de 8000 structures phénoliques ont été décrites dans la littérature. Ils ont été classés en deux familles : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (**Crozier *et al.*, 2009**).

Tableau V: Classes des composés phénoliques. (Ignat *et al.*, 2011 ; Mojzer *et al.*, 2016).

Classe	Sous-classe	Structure	Référence
Flavonoïdes	Flavonols		(Mojzet et al., 2016)
	Flavones		
	Flavonones		
	Anthocyanidines		
	Isoflavones		
	Catéchines		
Chalcones			
Acides Phénoliques	Acides Hydroxybenzoïques		(Mojzer et al., 2016)
	Acides Hydroxycinnamiques		
Tannins	Tannins Hydrolysables		(Ignat et al., 2011)
	Tanins condensés		

II.1.1. Les flavonoïdes

Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux dont plusieurs sont responsables des couleurs vives des fleurs, des fruits et des légumes (**Pietta, 2000; Ghedira, 2005**).

Les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agroalimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydant (**Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005**).

La structure de base de ces composés (**Figure 6**) est le diphenyle propane à 15 atomes de carbones (C₆-C₃-C₆) (**Bessaoud, 2015**), ils sont caractérisés par la présence de deux cycles benzéniques (A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (C) (**El Kabouss et al., 2011 ; Carvalho et al., 2013**).

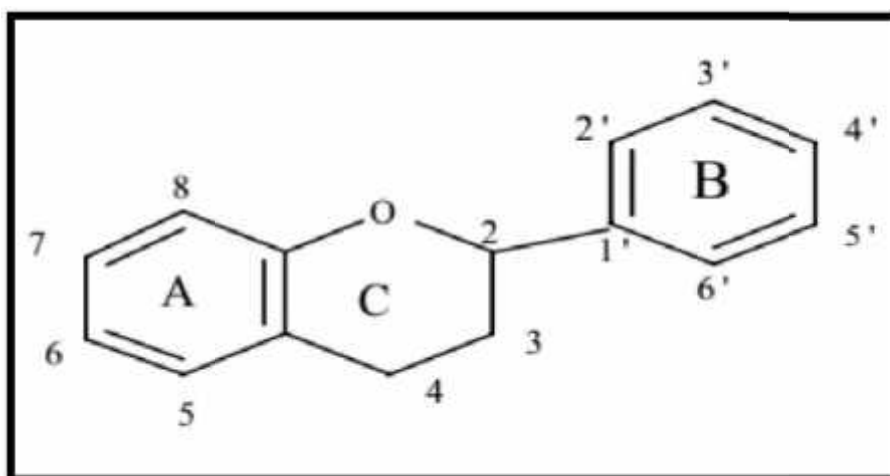
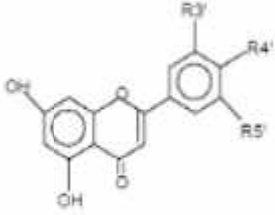
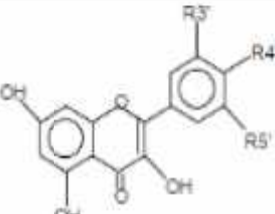
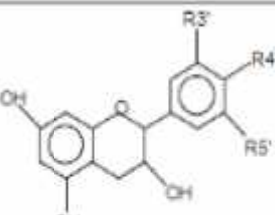
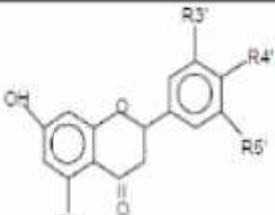
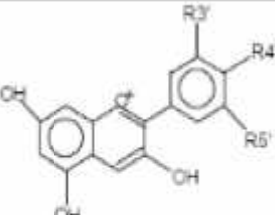
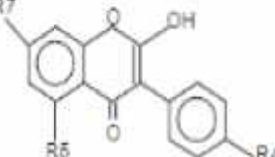


Figure 06 : Structure de base des flavonoïdes (**Bessaoud, 2015**).

Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes (**tableau VI**): anthocyanidines; flavonoles; isoflavonoles; flavones; isoflavones; flavanes; isoflavanes; flavanols; isoflavanols; flavanones; isoflavanones; aurones (**Havsteen, 2002; Edenharter et Grünhage, 2003**).

Tableau VI: Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

CHAPITRE III :
Présentation de
la plante

(Pinus halepensis Mill)

III Présentation de la plante (*Pinus halepensis* Mill)

III.1. Généralité

Le pin est la désignation générique des arbres appartenant au genre *Pinus*. L'origine de nom *Pinus* provient de mot « pit », c'est un mot Indo –Européen désignant une résine. Le pin est un gymnosperme de la famille des pinacées. Cette famille est la plus importante des conifères, dont plus de centaine d'espèces ont été décrites par plusieurs auteurs (**Judd et al., 2002**).

Le genre *Pinus* appartient à la famille des pinacées comprend plus de 120 d'espèces réparties dans le monde entier et essentiellement autour des côtes méditerranéennes, appelés aussi les résineux ou sécrétrices de la résine, une substance visqueuse utilisée dans la fabrication de nombreux produits. Elles sont des arbres ou plus rarement des arbustes aux rameaux régulièrement verticillés. Les feuilles sont en forme d'aiguilles et persistantes (**Ching et al., 2010**).

Pinus halepensis Mill est une espèce largement répandue sur le pourtour méditerranéen. Cette espèce est souvent connue sous le nom de pins méditerranéens du groupe *Halepensis* ou pin d'Alep en français, Sanawbar el halabi en arabe et Azoumbei en berbère (**Nahal, 1962**).

III.2. Classification de *Pinus halepensis* Mill

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**). Le pin d'Alep appartient à la famille des pinacées (Abietaceae), genre *Pinus*, sous genre *Pinus* (*Eupinus*), section *Halepensis*, et sous-groupe *halepensis*. (**Ozenda, 2006**).

La première classification du pin d'Alep est celle de Miller établie en 1769, reprise par **Ozenda. (2006).**

Règne : Plantae.

Sous-règne : Tracheobionta.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous-embranchement : Gymnospermes.

Classe : Pinopsida.

Ordre : Coniferales, Pinoidine, Pinale

Famille : Pinaceae.

Sous-famille : Pinoideae.

Genre : Pinus.

Espèce : *Pinus halepensis* Mill.

III.3. Aspect botanique de *Pinus halepensis*

Le pin d'Alep est un arbre toujours vert et vivace de hauteur qui dépasse vingt mètres. Il est doté d'un tronc tortueux, couvert d'une écorce épaisse et crevassée. Son écorce gris argenté et lisse tournant à la brune rougeâtre avec l'âge. Ses aiguilles ont une couleur de vert jaunâtre, elles sont molles, lisses, et fines de 0,7 mm de diamètre, et de 6 à 10 cm de long (Nahal, 1962). Ses cônes sont ovoïdes, aigues, de couleur brun luisant, portés par un pédoncule épais constamment recourbé, de 5 à 12 cm de long sur 4 de large, restant trois ans sur l'arbre (Grossenbacher, 2011). Ses grains s'échappent au cours du mois de juillet, août de la troisième année d'apparition du cône (Kadik, 1987). De couleur gris argenté et lisse chez les jeunes arbres, puis brune rougeâtre, en caille mince et large chez les plus âgés (Nahal, 1962).



Figure 07 : Arbres de *Pinus halepensis* Mill (Sbay et Hjib, 2012)

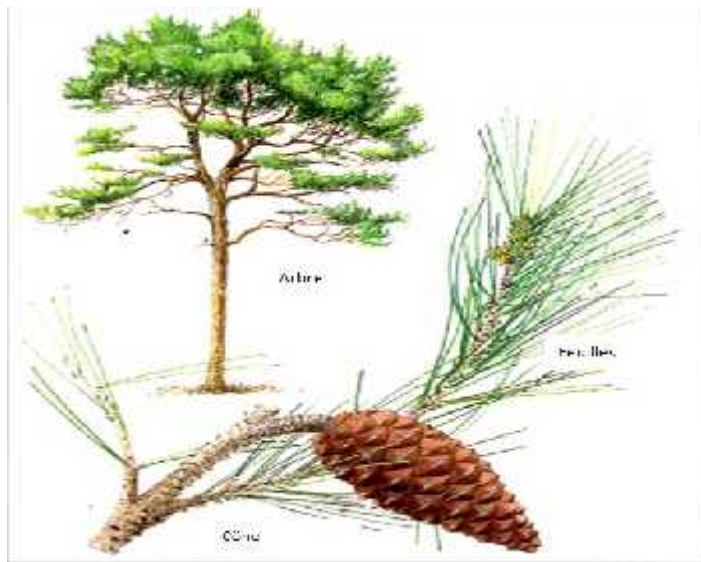


Figure 08 : *Pinus halepensis* Mill (arbre, feuilles, cône) (Jacues brosse, 2003).

III.4. Composition chimique du genre *Pinus*

Chimiquement, la famille des *Pinaceae*, dont les pins font partie, est surtout caractérisée par la présence de résines, de tanins, de terpènes, de lignans et de quelques stilbènes. Dans tous les conifères, la résine, ou oléorésine, est présente de façon constitutive (synthétisée dans des structures anatomiques très spécialisées) ou induite (généralement provoquée par des attaques d'insectes ou d'agents pathogènes) (**LaFever et al., 1994**).

La résine des pins est un mélange complexe de terpènes constitué d'une partie volatile appelée térébenthine et d'une partie non volatile appelée colophane (rosin) (**Zinkel et al., 1989**).

III.5. Usage et activité biologique

Les principales utilisations de pin sont liées à la production de la résine. Le pin d'Alep donne environ 3 Kg de résine (la gemme) par arbre et par an, La gemme pure contient 20 à 24 % d'essence de térébenthine et 75 à 80% de cellophane, elle a aussi des usages médicaux (**Kadik, 1987**).

Le pin est utilisé dans le domaine cosmétique grâce à sa richesse en acide gras, vitamine E, polyphénols et antioxydants naturels. Les graines de pin sont comestibles et utilisées en pâtisserie et confiserie (**Colonel et al., 2011**). Ses bourgeons très résineux, sont utilisés comme balsamiques, diurétique et antiseptiques (**Kadik, 1987**).

Les pins sont largement utilisés en médecine traditionnelle algérienne comme antiseptique puissant, ils sont recommandés pour les infections des voies respiratoires, urinaires, les calculs biliaires, la sinusite et le rhumatisme (**Lucienne, 2010**).

Plusieurs études indiquent que les métabolites des espèces de genre *Pinus* présentent des activités antioxydantes et anti-inflammatoires qui sont en générales associées à la présence des polyphénols et des flavonoïdes. Les extraits des aiguilles notamment les huiles essentielles, ont montré une activité anti-bactérienne, anti-inflammatoire et anticancéreuse. Ainsi l'écorce possède une activité anti-inflammatoire et antioxydante. (**Cheikh-Rouhou et al., 2008**).



**PARTIE
EXPERIMENTALE**

CHAPITRE I :

Matériel et méthodes

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel

I.1.1. Appareillage et produits chimique

Pour réaliser cette étude, on a utilisé un ensemble d'équipements, de verreries, d'appareillages et de produits chimiques.

I.1.1. Matériel végétale :

I.1.1.1. Récolte de la plante

Le matériel végétal utilisé correspond à l'écorce de l'espèce *Pinus halepensis*. La récolte s'est effectuée en février 2019 au niveau de la région Djaafra (colla) (Wilaya de bordj Bou Arreridj).

I.1.1.2. Séchage et Broyage de la plante

Le matériel végétal recueilli a été séché pendant 3 jours à une température ambiante et à l'abri de la lumière, afin de préserver au maximum l'intégrité de leurs molécules et d'éviter la dégradation des principes actifs Après séchage.

La parties de la plante a été broyé à l'aide d'un mortier jusqu'à obtention d'une poudre très fine. La poudre obtenue a été ensuite tamisée afin de pouvoir récupérer une poudre fine et homogène puis stocké soigneusement dans un endroit sec en vue de leur utilisation.

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation de l'extrait aqueux (décoction)

La préparation de l'extrait aqueux par décoction consiste à introduire 100g de la poudre d'écorce de *Pinus halepensis* dans 300 ml d'eau distillé, Le mélange est agité et chauffé jusqu'à l'ébullition pendant 10 min sur une plaque chauffante .la partie solide séparée de la partie liquide par filtration avec un papier filtre (papier wathman) (la filtration est répéter deux fois). L'eau est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota vapeur à 57°C, puis séchage dans l'étuve à 38 °C. L'extrait sec est récupéré par grattage et conservé jusqu'à son utilisation.

I.2.2. Préparation de l'extrait méthanolique (macération)

Une quantité de 25 g de poudre de l'écorce de *Pinus halepensis* est mis à macérer dans 250 ml de méthanol absolue pendant 24 h à température ambiante et a l'abri de la lumière. Le macérât est ensuite filtré par une filtration sous vide, le méthanol est éliminé du filtrat par

évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur à 41°C puis séchage dans l'étuve à 38 °C. L'extrait sec est récupéré par grattage et conservé au congélateur jusqu'à son utilisation.



Figure 09 : Macération

I.2.3. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est déterminé par le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant et la masse de la poudre végétal utilisée.

Le rendement a été calculé comme suit :

$$\mathbf{R(\%) = (Me / Mv) \times 100}$$

R(%) : Rendement en %

Me :Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction (**Harborne, 1998**).

I.2.4. Evaluations des taux des composés phénoliques

I.2.4. 1. Dosage des phénols totaux

La teneur en composés phénoliques des extraits de *Pinus halepensis* Mill a été estimée on utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu selon (**Li et al., 2007**).

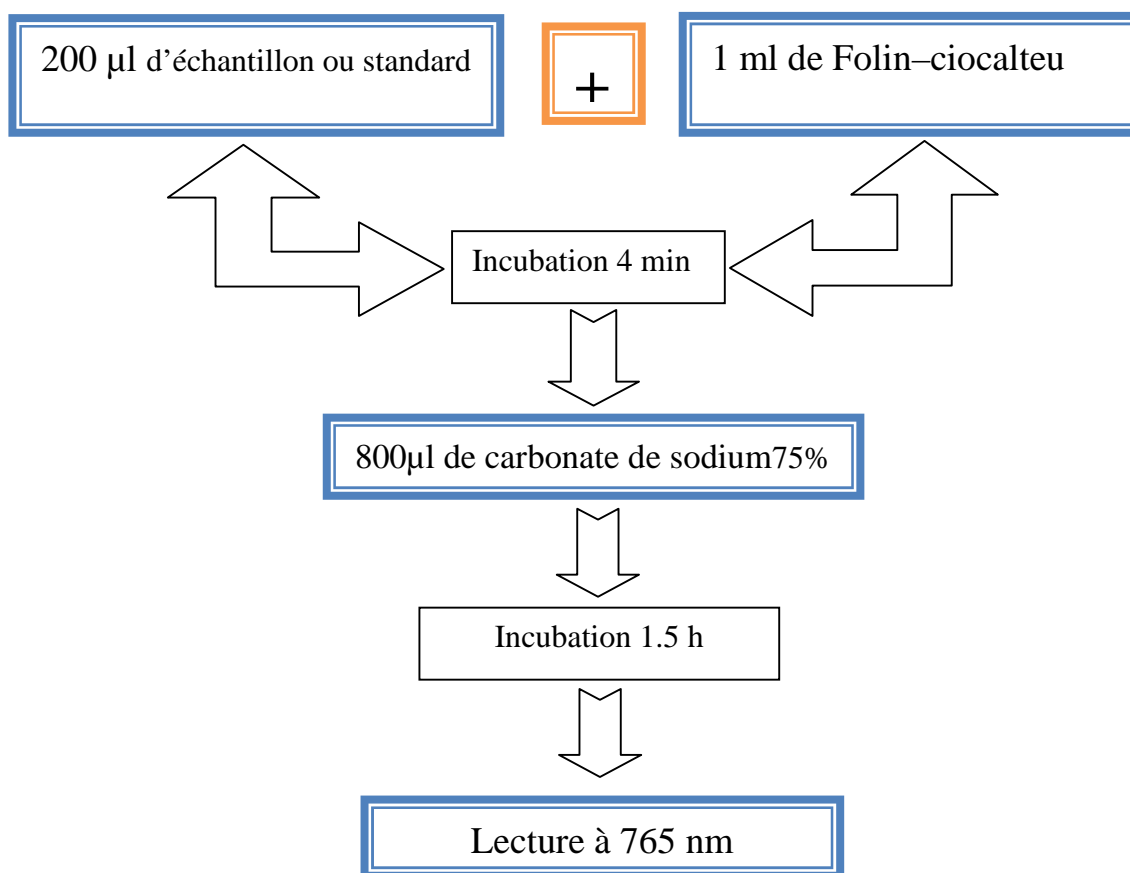
I.2.4.1.1. Principe

Le réactif de Folin est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H3PW12O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMo12 O40) de couleur jaune (**Boizot et Charpentier, 2006**).dans lesquels le tungstène et le molybdène sont à l'état oxydé. Mais en

présence d'un réducteur (dans ce cas le cycle phénolique), le bleu de tungstène et le bleu de molybdène est formé (Agbor et al., 2014). Ces complexes absorbent fortement à 765 nm et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Enneb et al., 2015).

I.2.4.1.2. Mode opératoire

Un volume de 1 ml de réactif de Folin (10% : 10 fois dilué) est ajouté à 200 μ l d'échantillon (chaque extrait est préparés dans son solvant d'origine) ou standard (préparés dans le méthanol absolue) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 1.5 h d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765nm par un spectrophotomètre. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 μ g/ml) et est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).



Protocole de dosage des polyphénoles

I.2.4.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanolique de *Pinus halepensis* Mill.

I.2.4.2.1. Le principe

La présence du groupement hydroxyle (OH) libre en position C3 ou C5 dans les flavonoïdes provoque la formation de complexes flavonoïdes-aluminium, qui donne par chélation de l'ion Al^{3+} une coloration jaunâtre. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait (**Quettier et al., 2000**).

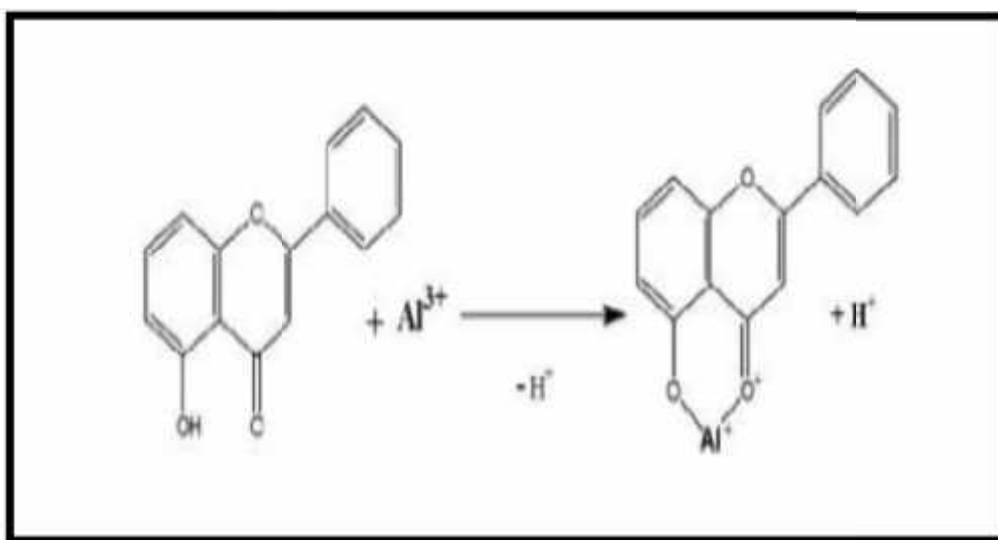


Figure 10 : Réaction du chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes (**Ribéreau-Gayon et Gautheret, 1968**).

I.2.4.2.2. Mode opératoire

Un volume de 1ml d'extrait (chaque extrait est dilué dans son solvant d'origine) ou standard est ajouté à 1ml d' $AlCl_3$ (Solution méthanolique à 2%). Après 10min de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm par un spectrophotomètre. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 $\mu g/ml$) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

I.2.5. Etude de l'activité anti-radicalaire : test de DPPH

I.2.5.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux de *Pinus halepensis* a été évaluée vis-à-vis du Diphénylpicryl-hydrasyl (DPPH) comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par **Mansouri et ces collaborateurs (2005)**.

I.2.5.1.1. Le principe

La méthode du DPPH[•] (diphénylpicryl-hydrasyl) est basée sur la réduction de l'espèce radicalaire stable DPPH[•] en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPHH (diphényl Picryl-hydrazine) (**Mansouri et al., 2005**).

En présence des piègeurs des radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en DPPHH de couleur jaune (**Figure 11**) (**Maataoui et al., 2006**). L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

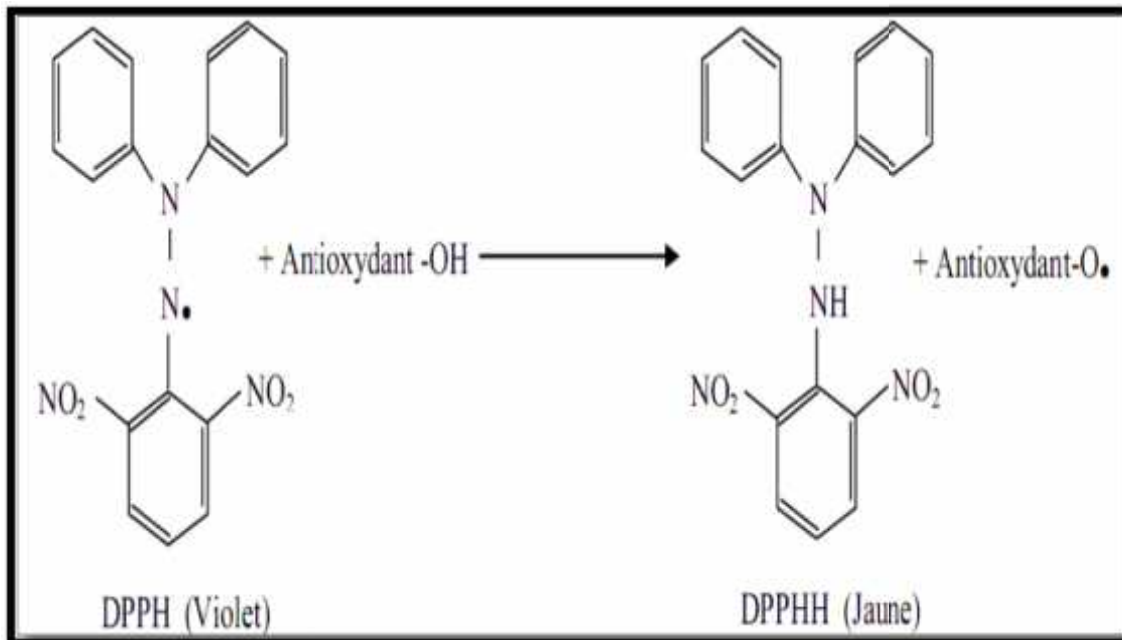


Figure11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (**Talbi et al., 2015**).

I.2.5.1.2. Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol pure. 100 µL des solutions d'extraits ou standards (acide ascorbique) sont ajoutés à 1900 µL de DPPH. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélange 100 µL de méthanol pure avec 1900 µL de la solution de DPPH.

Après 30 min d'incubation à l'obscurité, la décoloration par rapport au contrôle négatif est mesurée à 517 nm. L'activité antir-adicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{d'activité antiradicalaire} = [(\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs₅₁₇ contrôle: absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait

Abs échantillon₅₁₇: absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait.

CHAPITRE II :
Résultats et
discussions

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.1. Préparation des extraits

L'extraction est une étape très importante dans l'isolation, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques (**Buci -Koji et al., 2007**).

L'extraction des composés phénoliques dans cette étude est faite par macération et la décoction.

L'extraction utilisée dans cette étude est de type solide-liquide (contact direct entre le solide et le solvant). Son principe consiste à la séparation des composés phénoliques solubles par diffusion à partir d'une matrice solide (poudre) en utilisant une matrice liquide (solvant). Quand une matrice solide est en contact avec un solvant, les composants solubles dans le matériel migrent vers le solvant ; ainsi, l'extraction est due au transfert de matière du principe actif de la matrice vers le solvant, selon un gradient de concentration (**Kamaliroosta et al., 2012**).

La préparation des extraits à partir d'écorce de *Pinus halepensis* Mill a été effectuée par deux méthodes différentes décoction et macération dans l'eau distillée et le méthanol respectivement. De ce fait, deux extraits différents ont été obtenus: l'extrait aqueux (EAq), l'extrait méthanolique (EMe). La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids de la matière végétale utilisée pour l'extraction sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII : Aspects, couleurs et rendements des extraites de *Pinus halepensis* Mill.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement
EAq	Poudre	Marron noircie	2.38 %
EMe	Poudre	Marron	13.52 %

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique représente le rendement le plus élevé (13,52%) par rapport à l'extrait aqueux (2.38 %).

Il est important de souligner que la variation des résultats d'un extrait à l'autre est influencé par la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), la préparation de l'extrait méthanolique à température ambiante durant un contact prolongé avec le solvant permet d'obtenir le maximum de composé et de prévenir leur dénaturation due aux températures élevées et donne

un meilleur rendement. Par contre la préparation d'extrait aqueux à température élevée et pendant un temps court diminue le contact avec le solvant et donne par conséquent un faible rendement.

II.2. Analyse des extraits de *Pinus halepensis* Mill.

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation quantitative des polyphénols totaux est évaluée selon la méthode de Folin Ciocalteu décrite par (Li *et al.*, 2007). L'acide gallique a été utilisé comme standard.

Les teneurs en phénols totaux des deux extraits méthanolique et aqueux analysés sont représentées dans la (Figure 12), ils sont exprimées en μg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait) en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions (Figure 13).

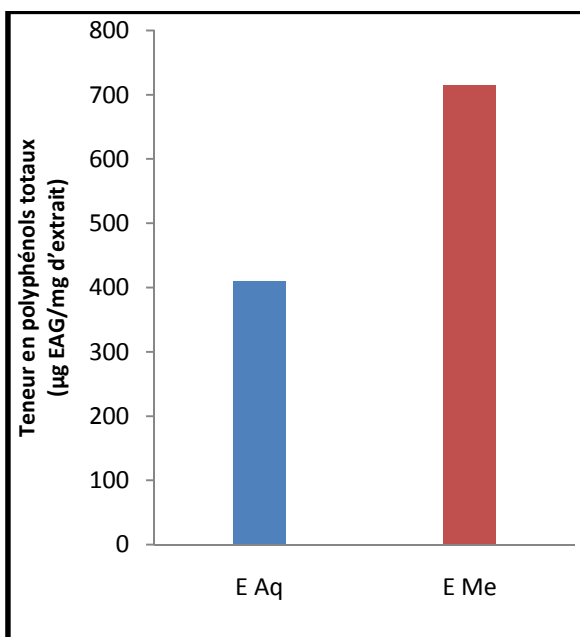


Figure 12 : Dosage des polyphénols dans les extraits d'écorce de *Pinus halepensis*.

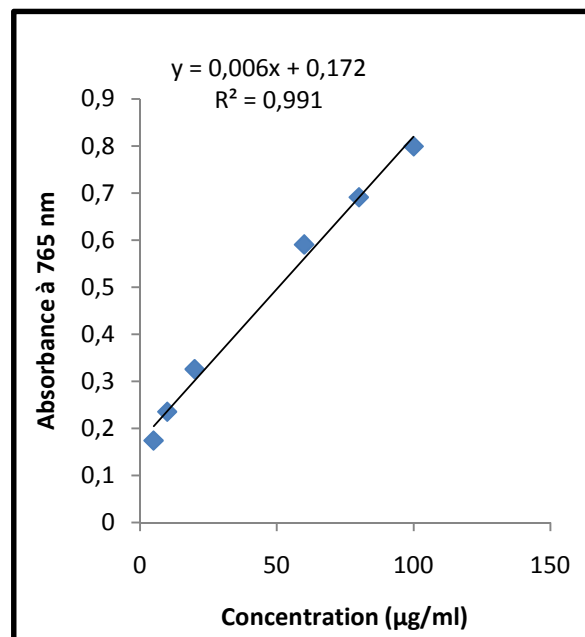


Figure 13 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait brut méthanolique contient $714.66 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait. Alors que l'extrait aqueux contient $410.66 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait.

Le teneur de l'EMe en polyphénols est très important ce qui montre que le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des polyphénols dans cette étude.

Selon l'étude menée par **Kadri et al. (2014)** faite sur les graines de *Pinus halepensis* (pin Algérien), les teneurs en phénols totaux dans l'extrait méthanolique sont de 3, 71 mg EAG/ g E. Par contre, **Lantto et al. (2009)** ont révélés une teneur élevée en phénols totaux (266 mg EAG/ g E) dans l'extrait acétonique des graines de *Pinus halepensis* (pin Sibérien). Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues avec cette étude.

Les travaux de **Nigro (2016)** réalisé sur les parties aériennes de la même espèce (les cônes, et les feuilles), ont révélé une forte concentration de polyphenols dans les extraits de cônes par rapport aux extraits de feuilles, les extraits eau-acétone de cônes et de feuilles renferment 731,01 et 266,81µg EAG/mg E respectivement.

Cette fluctuation des résultats trouve probablement son explication dans la différence d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques à savoir les conditions de croissance, le processus de maturation, et les conditions de stockage (**Bergonzi et al., 2001 ; Wang et Zheng, 2001**), ou bien les facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol... . la méthode d'extraction peut également influencer la teneur en composés phénoliques (**Ebrahimzadeh et al., 2008**).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**) en utilisant comme standard la quercétine.

Les résultats sont représentés dans la (**Figure 14**) et sont exprimés en µg équivalent de quercétine/mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait), en se référant à une courbe d'étalonnage (**Figure 15**) réalisée dans les mêmes conditions.

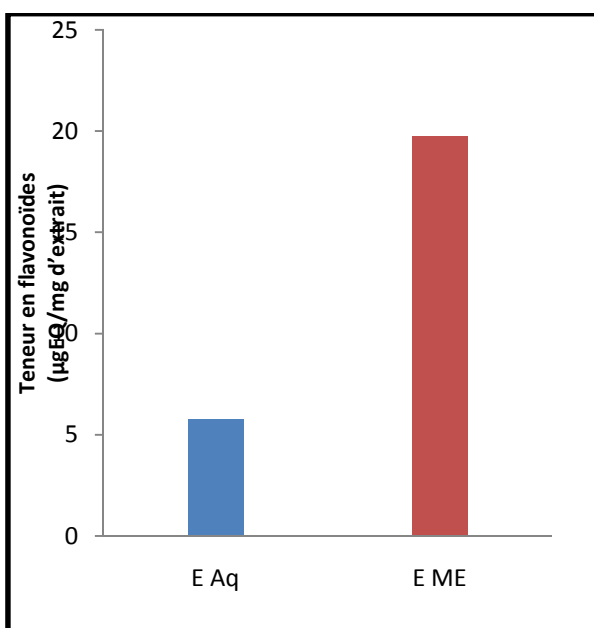


Figure 14 : Dosage des flavonoïdes dans les extraits d'écorce de *pinus halepensis*.

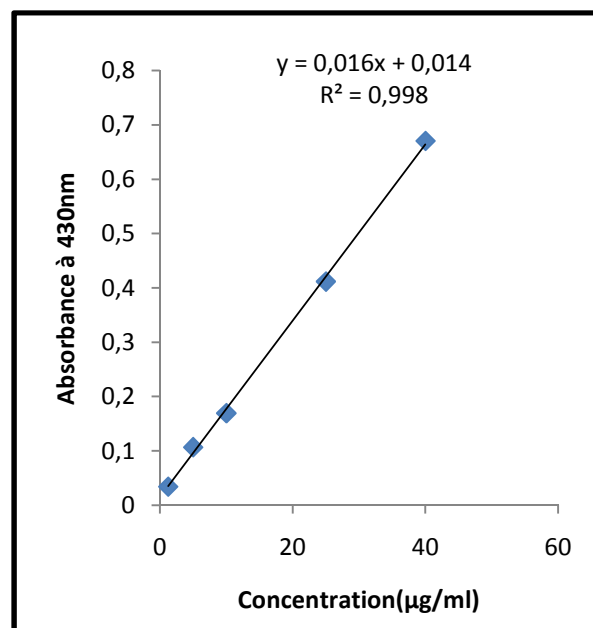


Figure 15 : Droite d'étalonnage de la quercétine.

Il apparait clairement que l'EMe a une teneur plus élevée en flavonoïdes (19.75 µg EQ/mg d'extrait), que l'EAq (5.75µg EQ/mg d'extrait).

Les taux des flavonoïdes obtenues dans la présente étude sont inférieures à ceux déterminés dans la même espèce (*Pinus halepensis*) par **Nigro (2016)**, qui a révélé une forte concentration de flavonoïdes dans les extraits de cônes par rapport aux extraits de feuilles, 270,21µg EC/mg d'extrait pour la fraction n-butanol de cônes et 54,5µg EC/mg d'extrait pour la fraction acétate d'éthyle de feuilles.

Tandis que l'étude menée par **Kadri et ces collaborateurs (2014)** sur les graines de *Pinus halepensis* (pin Algérien), révèle un taux de flavonoïde très faible dans l'extrait méthanolique de (0,80 g EQ/ g d'extrait).

La variation des taux en polyphénols et flavonoïdes dépend de la variabilité des espèces. Elle est probablement induite par différences dans les métabolismes entre celles-ci (**Tovar et al., 2002**). Plusieurs auteurs ont également rapporté que la variation des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes peuvent être liés aux origines géographiques, et les paramètres d'extraction (**Servili et al., 2004**).

II.3. Activité anti-radicalaire

II.3.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire des deux extraits aqueux et méthanolique de l'écorce de *Pinus halepensis* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm.

Les profils d'activité anti-radicalaire obtenus (**Figure 16, 17, 18**) révèlent que les extraits de *Pinus halepensis* possèdent une activité anti-radicalaire dose dépendante.

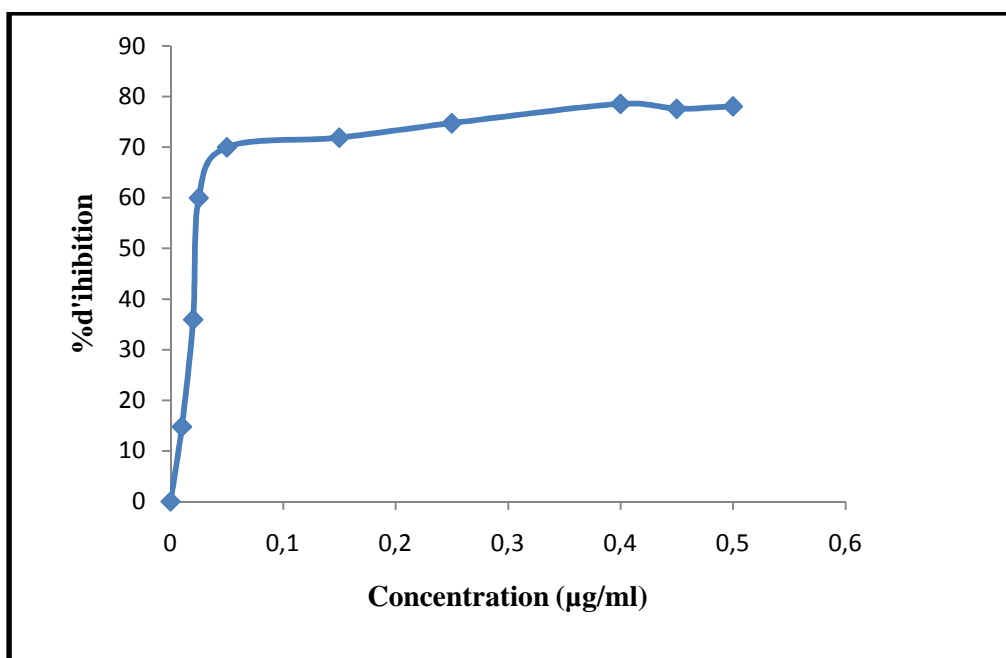


Figure 16 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en présence de l'extrait méthanolique.

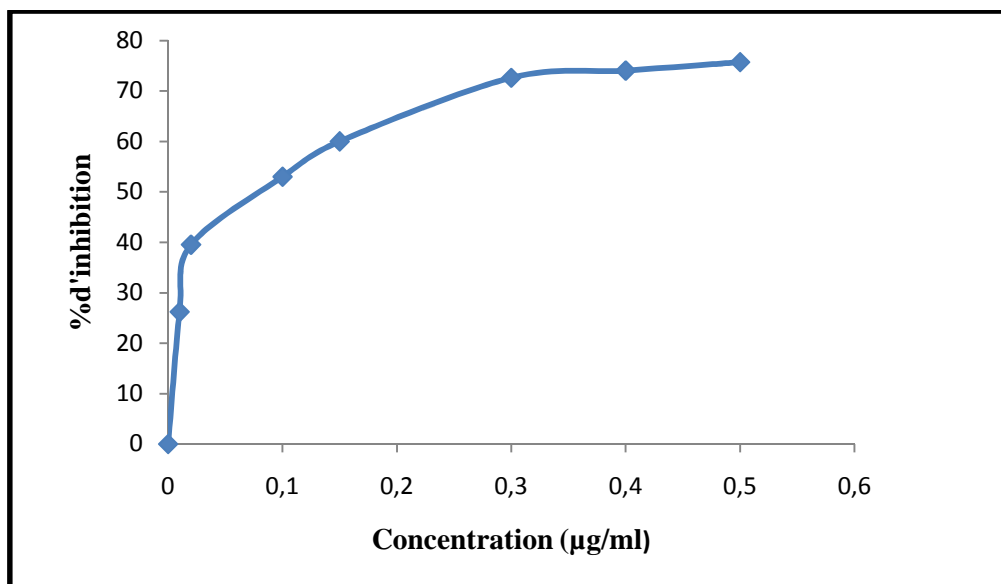


Figure 17 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en présence de l'extrait aqueux.

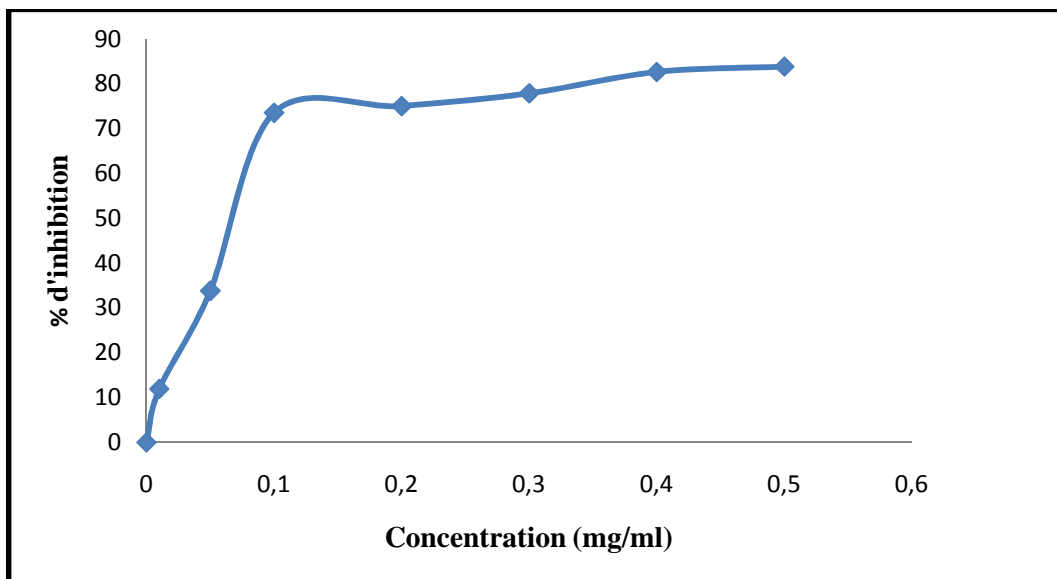


Figure 18 : Activité anti-radicalaire de l'acide ascorbique

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, le paramètre IC_{50} est introduit. L' IC_{50} est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydants nécessaires pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante est élevée.

La concentration de l'échantillon essentiel pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

Les IC_{50} trouvées sont représentées dans la (**figure 19**), Les résultats obtenues montrent une activité anti-radicalaire considérables dans les deux extraits de *Pinus halepensis* avec des IC_{50} de l'ordre de 0.02 $\mu\text{g/ml}$ et 0,08 $\mu\text{g/ml}$ l pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement. L'extrait méthanolique possède une activité anti-radicalaire presque 4 fois supérieure à celle de l'extrait aqueux.

L'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,06 \mu\text{g/ml}$) possède une activité anti-radicalaire supérieure à celle de l'extrait aqueux mais inférieur à celle de l'extrait méthanolique.

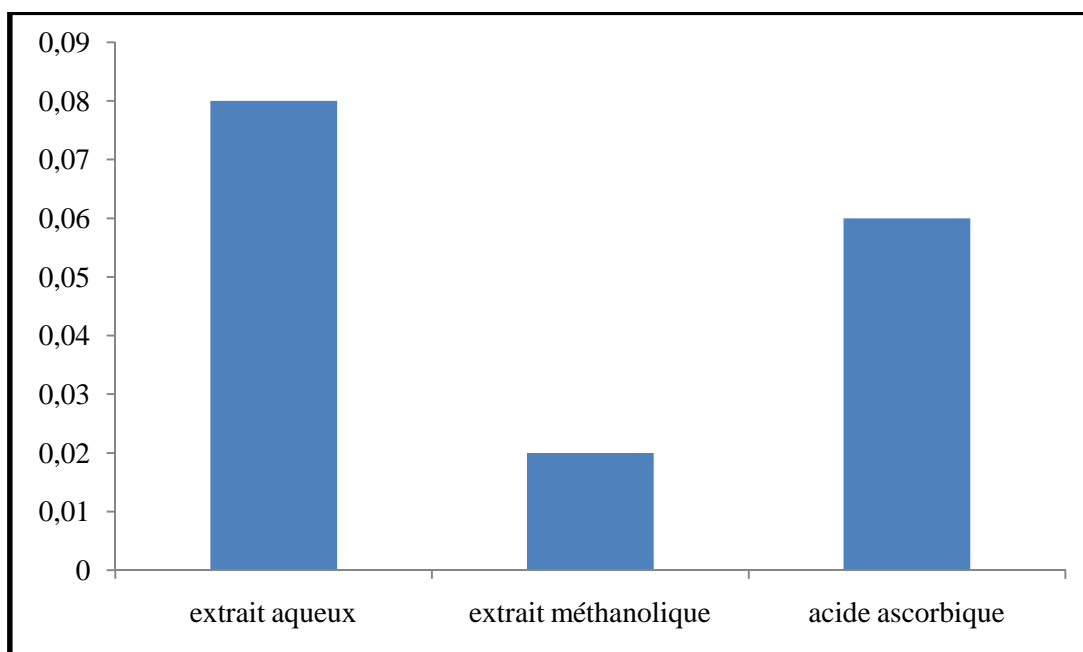
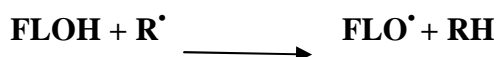


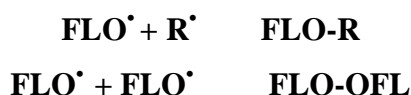
Figure 19 : IC_{50} de l'extrait aqueux et méthanolique et le standard (acide ascorbique)

Les travaux de **Nigro, (2016)** ont révélé une activité anti-radicalaire faible par rapport à la présente étude avec des IC_{50} élevées allant jusqu'à $5,01\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait eau-acétone de cônes découpées et $61,46\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux de feuilles fraîches de *Pinus halepensis*.

L'activité élevée de l'extrait méthanolique est attribuée probablement à sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes. En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres ($R\bullet$) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle selon la réaction suivant :



Cette réaction donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyyle ($\text{FLO}\bullet$) qui va subir un changement de structure par résonance, redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux $\text{R}\bullet$; en outre les radicaux flavoxyyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs. (**Amié et al., 2003**)



L'activité antioxydante de polyphénols spécifiquement de flavonoïdes dépend généralement de leur structure chimique et la distribution de leurs groupements hydroxyl, en effet les groupements 3 et 4- orthodihydroxy sur le cycle B et le groupement 4- carboxy sur le cycle C sont responsables de l'effet scavenger des radicaux libres tandis que le groupement 3OH et/ou 5-OH sur le cycle C est très intéressant pour l'effet antioxydant. L'absence de structures O- dihydroxy sur le cycle B donne une structure catéchol sur le cycle A qui peut largement compenser l'activité antioxydante des flavonoïdes (**Adida et al., 2016**).



CONCLUSION

Conclusion

Les plantes médicinales sont considérées depuis des siècles comme une source majeure des produits utilisés en thérapeutique. Parmi ces produits, on trouve les polyphénols qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêts en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies (**Meziti, 2008**).

Le *Pinus halepensis* est une plante largement exploitée dans la médecine traditionnelle.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux et de flavonoïde des extraits de l'écorce *Pinus halepensis* de par la méthode de folin-ciocalteu et trichlorure d'aluminium révéla la richesse de l'extrait méthanolique en comparaison avec l'extrait aqueux.

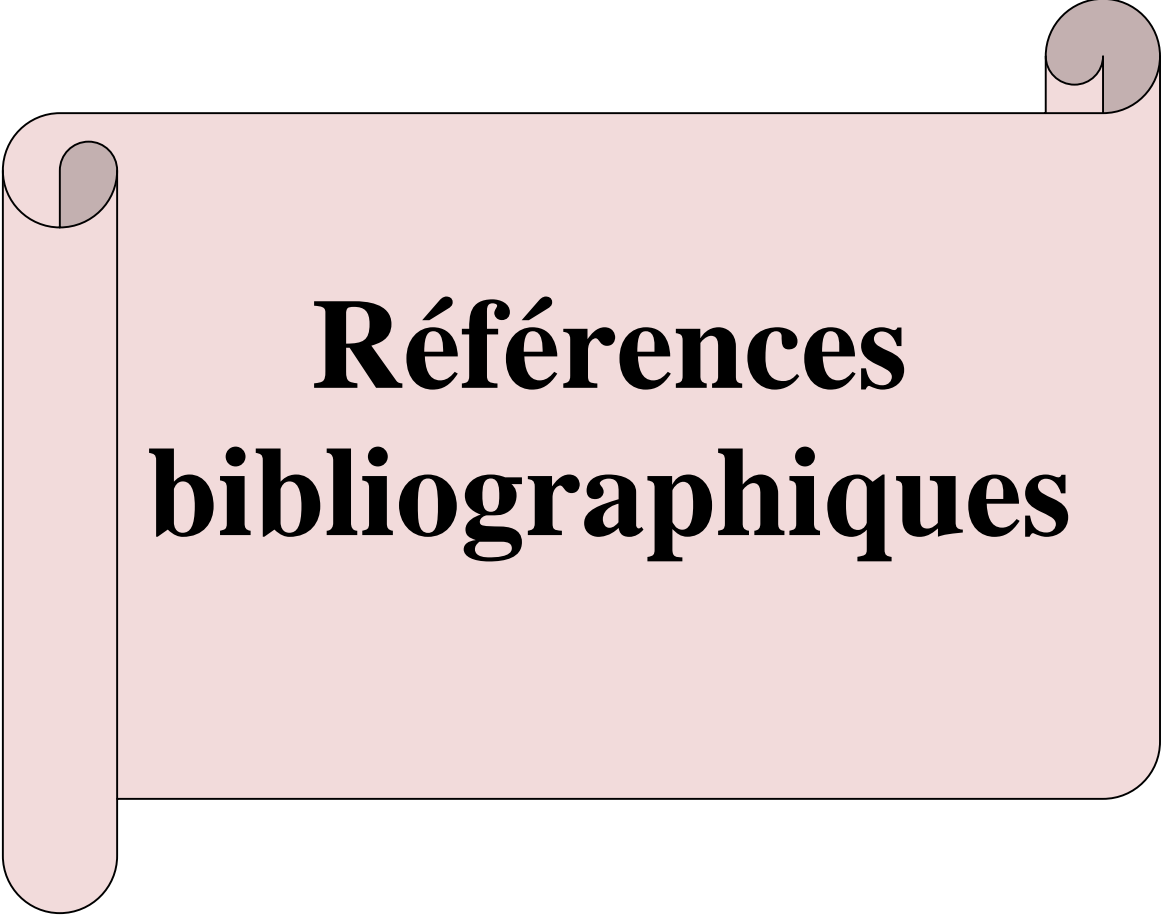
De même, l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits étudiés par la méthode de piégeage de radical libre DPPH, montre que l'extrait méthanolique présente un pouvoir anti-radicalaire plus important que celui de l'acide ascorbique et de l'extrait aqueux.

L'activité importante exercée par l'extrait méthanolique s'expliquent probablement par sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes.

Ces résultats montrent que le *Pinus halepensis* est l'une des plantes médicinales traditionnelles qui possède de nombreuses propriétés biologiques, qui sont attribuées à sa richesse en composés phénoliques.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que les extraits testés et plus particulièrement l'extrait méthanolique contient des antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, et comme perspectives on propose :

- D'identifier les molécules par des méthodes plus performantes HPLC, spectro de masse.
- De confirmer l'activité antioxydante par des études in vivo.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **A. Crozier, M. N. Clifford, H. Ashihara. (2006).** Plant Secondary Metabolites, Blackwell Publishing, Oxford UK.
- **Adida, H., Benariba, N., Bechiri, A., Chekroun, E., & Djaziri, R. (2016).** Etude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie*, **14(4)**, 207-212.
- **Amié .D.,Davidovié-Amié.D.,Beslo.D.et Trinajstić.N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*,**76(1)** ,55-61.
- **Atamer A., Bilici A., Yenice N., Selekt S., Ilhan N., Atamer Y. (2008).** The importance of paraoxonase I activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis, *J In Med Res* **36**, 771-776.
- **Atmani, D., Chaheer, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. (2009).** Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, **112**: 303-309.

B

- **Baba, L. & McGrath, IM. (2008).** Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *Advances in Neonatal Care* **8** Journal, pp. 256-264.
- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. **46**, 1086-1089
- **Bennamara, F. Z. (2017).** Stress oxydant Et pathologies humaines. Thèse de doctorat : pharmacie. UNIVERSITE MOHAMMED V-RABAT.
- **Berger, M.M. (2006)** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **20**: 48-53.
- **Bergonzi, M.C., Bilia, A.R., Gallori, S., Guerrini, D. and Vincieri, F.F. (2001).** Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Development and Industrial Pharmacy*.**27**: 491-497.
- **Berroukche, A., Amara, S., Halimi, S., & Benyamina, F. (2014).** Evaluation of the Leave and Bud Decoctions *Pinus halepensis* Mill Effects on the Induced-Phenol Renal Toxicity in Wistar Rats. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, **6(2)**, 197-207.
- **Bessaoud, S. (2015).** Evaluation de quelques paramètres de la balance oxydants/antioxydants chez des rats diabétiques recevant de la quercétine.
- **Boizot, N. and Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *INRA-Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyse Biochimique*.
- **Buci -Koji , A., Planini , M., Tomas, S., Bili , M., and Veli , D. (2007).** "Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds." *Journal of Food Engineering*, **81(1)**, 236-242

C

- **Carange, J. (2010).** Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection ? Thèse de doctorat. Université du Québec Trois-Rivières.
- **Carvalho, O., Botelho, C., Ferreira, C., Ferreira, H., Santos, M., Diaz, M., Oliveira, T., Soares-Martins, J., Almeida, M., and Jnior, A. S. (2013).** "In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: implications of structural differences for antiviral design." *Research in veterinary science*, **95(2)**, 717-724.
- **Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2008).** Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21(2)**, 162-168.
- **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. *Revista de Agarquímica y Tecnología de Alimentos*, **12(5)**, 407-415.
- **Ching, P.L., Jen, P.H., Chung-S, W., Chih, Y.H. and Chaw, S.M. (2010).** Comparative Chloroplast Genomics reveals the evolution of *Pinaceae* Genera and Subfamilies. *Genome Biology*. **2**: 504–517.
- **Christelle, K. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* **20** :165–177
- **Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K and Lim P E (2010).** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **10** (53), 2-8.
- **Costa, V., Moradas-Ferreira, P., Mol. (2001).** *Aspects. Med.*, **22**, 217-246.
- **Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., (2009).** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* **26**, 1001–1043.
- **Delattre, J., 2007.** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques, 2 ed. Tec & doc. Medicales internationales, Londres, Paris, New York.

D

- **Delattre, J., Durant, G., Jardillier, C. (2003).** Biochimie pathologique, aspects moléculaires et cellulaires. Edition Flammarion, pp : 176.
- **Desmier Thomas. (mars 2016)** Thèse d'exercice. Université de Limoges .
- **Di Simplicio P, Cheeseman K H, Slater T E .(1991)** The reactivity of the SH group of bovine serum albumine with free radicals. *Free Rad Res Comm* **14**, 253-62.

E

- **Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. and Bekhradnia, A.R. (2008).** Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*. **7** (18): 3188-3192.

- **Edenharder R., Grünhage D.,**2003- Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumenehydroperoxide in *Salmonella typhimurium*TA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.
- **El Kabouss, A., Charrouf, Z., Oumzil, H., Faid, M., Lamnaouer, D., Miyata, Y., and Miyahara, K. (2011).** "Caractérisation des flavonoïdes des feuilles d'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels, Sapotaceae) et étude de leur activité antimicrobienne." *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, **21(3)**, 157-162.
- **Enneb, H., Belkadhi, A., CHEOUR, F. and Ferchichi, A. (2015).** Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology*, **20(2)** , 788-793.

F

- **Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. 2002.** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **18**, 872–879.
- **Favier A., (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* Mémoire d'Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. p 64, 390-396.
- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique novembre décembre*, p108-11-15.
- **Favier, A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. pp.108 -115.
- **Favier, A. (2006).** Stress oxydant : Stress oxydant et pathologies humaines. Département de biologie intégrée du Chu de Grenoble, F 38700 La Tronche, et SCIB-LAN Centre nucléaire de Grenoble, F 38054 Grenoble, 64 : 390-396.
- **Fridovich I. (1974).** Editorial: Superoxide radical and the bactericidal action of phagocytes. *NEngl JMed*; 290(1 1):624-625.

G

- **Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique, novembre – décembre*, 91-96.
- **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003)** .Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? n° p 91-96.
- **Ghedira K (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4, 162-169.
- **Goudable, J & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol* ; **11**,115-120.
- **Grossenbacher, E. (2011).** Pinède de pin d'Alep. *Groupe d'étude floristique du jura et du jura bernois*.
- **Gutteridge JMC, Halliwell PB. (1993).** Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Consequence. *Free Radic Res Commun*. 1 janv;**19(3)**:141-58.

H

- **Halliwell,B.Gutteridge,J.M.(1984).**Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.*Biochem. J* .**219**,1-14.
- **Han, D., Williams, E., Cadenas, E.,** *Biochem. J.*, (2001), **353**, 411-416.
- **Harborne J B., (1998).** Phytochemical Methods : A guide to moderne techniques of plant analysis. Ed 3. CHAPMAN & HALL. p : 202-209.
- **Harman,D.(2000).** Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci.*Vol **928**,1–21
- **Havsteen B.H., (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther. Nov-Dec*, **96** (2-3): 67-202.
- **Hellal Z., (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.
- **Hool. L.C.,** *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (2006). **33**, 146-151.
- **Hunt J, Wolff S. (1991).** The role of histidine residues in the non-enzyme covalent attachment of glucose and ascorbic acid to protein. *Free Rad Res* **14(4)**, 279-87

I

- **Ignat, I., Volf, I. and Popa, V.I. (2011).** A critical review of methodes for characterisation of polyphénolic compound in fruits and vegetables. *Food chemistry*, **126**, 1821-1835.
- **Iserin P., (2001).** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Identification, Préparation, Soins. Dorling Kindesley Limited 2ème édition, Londres,p :10.

J

- **Jaccot B., CampilloB. (2003).**nutrition humaine. Masson, Paris.311.
- **Judd W.S., Campbell C.S., Kellog E.A., Stevens P. (2002).** Relation phylogenetique entre les principaux groups de trachiophytes à l'exclusion des angyospermes «Spermatophytes non angyospermes ». In. « Botanique système ». Ed. De Boeck. Paris. ISBN :2-7445-0123-9.152.
- **Jacues brosse, (2003).** Larousse des arbres dictionnaire des arbres et des arbustes, Edition Rustica/ FLER, Paris pp 325. N°de l'editeur ; 48396 N1 (F12062)
- **Jayaprakasha, G.K., Girenavar, B. and Patil, B.S. (2008).** Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges : Extraction efficiency of solvents in sequence. *Food Science and Technology*. **41**, 376-384.

K

- **Kadik B. (1987).** Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) En Algérie : Ecologie, dendrométrie, morphologie. Ed. OPU. Alger. P 581- 585-587

- **Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan- Montero, V. and Montero, J.L. (2014).** Antiangiogenic activity of neutral lipids ,glycolipids , and phospholipids fraction of pinus halepensis Mill. *Seeds. Industrial Crops and products.* **54.** 6-12.
- **Kamaliroosta, L., Gharachorloo, M., Kamaliroosta, Z., and KH, A. Z. (2012).** "Extraction of cinnamon essential oil and identification of its chemical compounds." *Journal of Medicinal Plants Research,* **6(4),** 609-614.
- **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme,* **20,** 165-177.
- **Kohen R, Nyska A (2002).** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology,* **30,** 620-650.

L

- **LaFever, R. E.; Vogel, B. S.; Croteau, R. (1994),** Diterpenoid Resin Acid biosynthesis in Conifers: Enzymatic Cyclization of Geranylgeranyl Pyrophosphate to Abietadiene, the Precursor of Abietic Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics:* 313 (1), p. 139-149
- **Laight,D.W.Carrier,M.J.Anggards,E.E.2000.**Antioxidants,diabetes and endothelial function. *Cardiovasc Res.***47,** 457-464.
- **Lantto, T. A., Dorman, H. D., Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Tikhonov, V. P., Hiltunen, R., Raasmaja, A. (2009).** Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry.* **112,** 936-943.
- **Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de nutrition et de diététique* **44,** 219-224.
- **Levine,R.L.Garland,D.Oliver,C.N.Amici,A.Climent,I.Lenz,A.G.Ahn ,B.W, Shaltiel S,Mc Cord JM 2000.** The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med .***108.** 652-659.
- **Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007)** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry.* **102,** 771-776.
- **Lucienne A. (2010).** Les plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Ed. Berti, Alger, p 200-201

M

- **Maataoui, B. S., Hmyene, A & Hilali, S. (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal.* N°.1,pp.3-8
- **Makhloufi, A. (2013).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru.
- **Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E & Kefalas, P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry.***89,** pp.411-420.
- **Margaill, I. Plotkine, M. and Lerouet. D. (2005).** Antioxydant strategies in the treatment of stroke. *Free radical biologie and medicine,* **39,** 429-443.

- **McCord JM, Fridovich. (1969).** I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals Generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *JBio1 Chem* 244(22):6056-6063.
- **Meziti, A. (2009).** Activité antioxydante des extraits des grains de *Nigella sativa* L. Etude in vitro et in vivo. Thèse de magistère. Département des Sciences Biologiques. Université de EL-Haj Lakhdar (Batna).
- **Meziti, H. (2008).** Evaluation de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de *Malva parviflora* L. Thèse de magistère. Département de Biologie. Université de FERHAT Abbas (Setif).
- **Mohammedi Z., (2005).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région du Tlemcen, Thèse de magistère. Université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen.
- **Mojzer, E.B., Hrnčič, M. K., Škerget, M., Knez, Ž. and Bren, U. (2016).** Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, **21(901)**, 2-38.
- **Moussa, M. H. (2011).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels, Université Badji Mokhtar de Annaba.

N

- **Nahal I. (1962).** Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. *Ann. Ecole eaux et forêts. Sta. Rech. Exp.* **19(4)**, p 1-207-208-533-627.
- **Nahal I. (1962)** - Le pin d'Alep. *Ann.Sc. Eaux et forêts, Nancy, XIX, 4.* NAHAL 1. 1977 - Le pin brutia (*Pinus brutia* Ten. ssp. brutia) et les facteurs climatiques. *Research Journ. Of Aleppo Univ.* **2**, 19-60.
- **Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishna D. R., (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.* **33**, 2-16
- **Ncube N.S., Afolayan A.J. et Okoh A.I. (2008).** Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology.* **7(12)**, 1797-1806
- **Nigro, H. (2016).** Contribution à l'étude phytochimique et à l'effet antioxydant des extraits de *Pinus halepensis*. (Doctoral dissertation).

O

- **Ozenda P (2006).** Les végétaux : organisation et diversité biologique. Ed. Dunod (2^{ème} éd.), Paris, 516p.

P

- **Parihar, A., Parihar, MS., Milner, S. (2008).** Bhat S. Oxidative stress and antioxidative mobilization in burn injury. *Burns*, **34**, 6-17.
- **Pasquier, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. N° 276. p 87-92.
- **Pietta PG (2000).** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.

- **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux, K., Defraigne J O., (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. **16**, 233-239.
- **Pincemail, J., and Defraigne, J.(2004).** "Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène." Presented at Symposium «antioxydants et alimentation», Institut Danone, Bruxelles.

Q

- **Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., et Luyckx, M. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hull and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 35-42.

R

- **Rao, P.S., Kalva, S., Yerramilli, A., and Mamidi, S. (2011).** Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science*, **4(2)**:89
- **Ribéreau-Gayon, P., and Gautheret, R. J. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux: Dunod Paris.
- **Richard, T., Tamsamani, H., Delaunay, J.C., Krisa, S. and Mérillon, J.M. (2014).** Stilbénes : de la chimie à la neuroprotection. *Cahiers de nutrition et de diététique*, **49** 173-180.
- **Ryan, I. (2013).** Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *Int J Sci*.

S

- **Salvayre R, Auge N and Nègre-Salvayre A (2003).** Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.F., Toussaint, M.P., Jacob, L., Lagrost, J., Chapman, Eds. Masson: Paris, **14**, 269-290.
- **Sanchez-Moreno, C. (2002)** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. **8**, 121-137.
- **Sbay, H & Hjib S. (2012).** Le pin pignon : une espèce de choix dans le contexte des changements climatiques. Editeur : centre de recherche forestière.
- **Scalbert, A. and Fardet, A. (2006).** stress oxydant et antioxydants à la recherche d'un nouveau paradigme. *NAFAS*, **4(1)**, 3-10.
- **Schubert J, Wilmer JW. (1991).** Does hydrogen peroxide exist "free" in biological systems? *Free Radic Biol Med*; **11(6)**,545-555.
- **Seifried, H. E., Anderson, DE., Fisher EI, Milner JA. (2007).** A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*; **18**, 567-579.
- **Servili, M., Selvaggini, R, Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G., (2004).** Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of chromatography*. 1054, p.113.

- **Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007).** Optimization of extraction of phenolics from *ginger* leaves using response surface methodology. *Séparation and purification Technology*. **55**, 381-387.
- **Su, X.Y., Wang, Z.Y., Liu, J.R. (2009).** In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus Koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. **117**, p. 681.

T

- **Talbi, H., Boumaza, K.M., Talbi, J. and Hilalai, A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Mate-Environ. Sciences*, **6 (4)**: 1111-1117.
- **Thannickal V J, Fanburg B L.(2000).** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* **279**, L1005-28.
- **Tovar, M. G., Paz Romero, M., Girona, J., Motilva, M.J. (2002).** L-phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea*) CV arbequina fruit grown under different irrigation regimes, *Journal of science of food and agriculture*. **82**, p.892. 173-180.

V

- **Valko M., Rhodes C J B., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. **160 (1)**:1-40.
- **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39(1)**, 44-84.
- **Vergely, C. Goirand, F. Ecartot-Laubriet, A. Renard, C. Moreau, J.-C. Guillard, D. (2003).** NF- κ B activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *Exper Biol and Med* . **228**, 855 - 865.

W

- **Wang, S.Y. and Zheng, W. (2001).** Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in Strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4977-4982.

Y

- **Yaacoub R., (2009).** Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux. L'intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés. Thèse de doctorat. N° 2009AGPT 0048. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech).

Z

- **Zinkel, D. F.; Russel, J.; (1989),** *Naval Stores: Production, Chemistry, Utilization*. Pulp Chemicals Association, New-York, a) p. 227-229; b) p. 262-270.

Annexe

Tableau I : Matériels et réactifs utilisés.

Produits :	Appareils et verreries :
<ul style="list-style-type: none">- Trichlorure d'aluminium $AlCl_3$.- Les étalons poly-phénoliques (quercétine, acide gallique).- Acide ascorbique.- Méthanol absolue.- Carbonate de sodium (Na_2CO_3).- Folin-ciocalteu.- DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl).	<ul style="list-style-type: none">- Rota vapeur (BÜCHI).k- Ballons pour le rota-vapeur.- Spectrophotomètre UV-visible (SHIMADZU : UV mini – 1240).- Etuve.- Agitateur magnétique.- Vortex.- Micropipettes.- Papier filtre.- Balance de précision.- Plaque chauffante.- Différents verrerie (bécher, tubes, entonnoirs, erlenmeyer...etc).