

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Science Biologique
Option : Biochimie et Biologie Moléculaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Activité antioxydante et
anti-inflammatoire de pin**

Présenté par :

M^{elle} MEDJDOUB Ouissam et M^{elle} OUBERNINE Hanane

Soutenu le : **19 juin à 13h30**

Devant le jury composé de :

M^{me} KARAKENDI S.	MAA	Présidente
M^{me} KHETTAL B.	MCA	Encadreur
M^{me} MAHDID A.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017

REMERCIEMENT

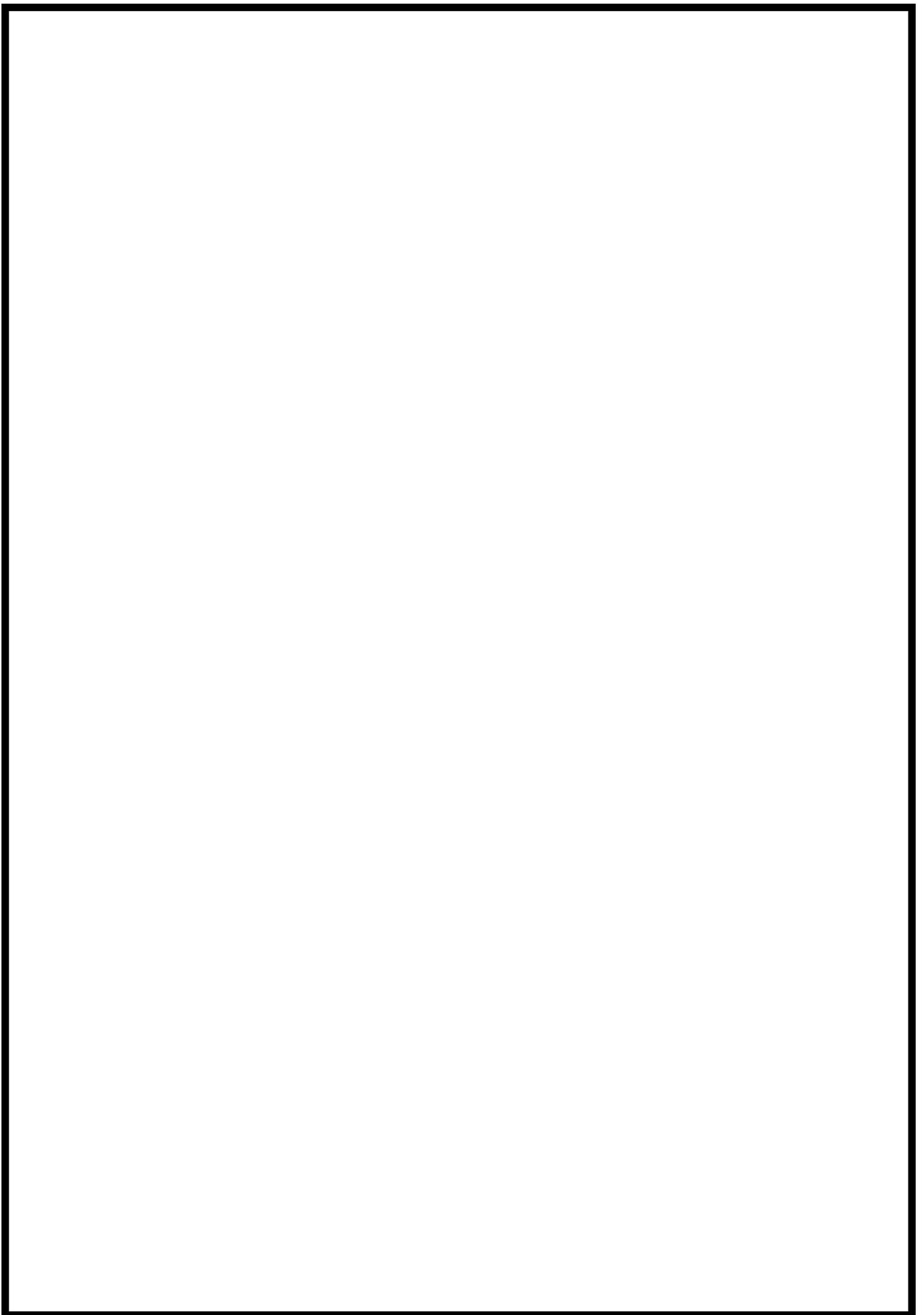
Au terme de ce modeste contribution je tiens a exprimer mes remerciements les plus sincères tout d'abord au « Bon Dieu », le tout puissant pour m'avoir donné la santé et la patience qui m'ont été utiles toute au long de mon parcours.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadreur Dr Khettal Bachra de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour son suivi ses conseils et qu'elles trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Mes sincères considérations et remerciements sont également exprimé aux membres de jury : M KARRA qui ma fait honneur de présider le jury, le Dr MEHEDID Amel qui ont accepté d'examiner mon travail.

Je tien a remercier énormément M^{elle} MAMASSE Habiba technicienne du laboratoire d'enzymologie, pour son assistance dans les manipulations leur amitiés, leur bonne humeur et leurs encouragements.

Nous remercions aussi toutes personnes qui ont participés de prêt au de loin à l'élaboration de ce travail.



Dédicaces

A mes très chères parents SAÏD et DJAMILA.

A mon frère MAAMAR,

A mes sœurs KAHINA et WASSILA.

A IYAD, IMAD et RACHID.

A mon fiancé MAHMOUD et sa famille.

A tous mes cousins, mes voisins et tous mes amis.

A mes très chères parents ALI et FAZIA.

*A mes frères FAOUZI, SIEF EDINNE, SOUFIANE
et Hilal.*

A ma sœur SAFINAZE.

A mon fiancé HOUSSEM et sa famille.

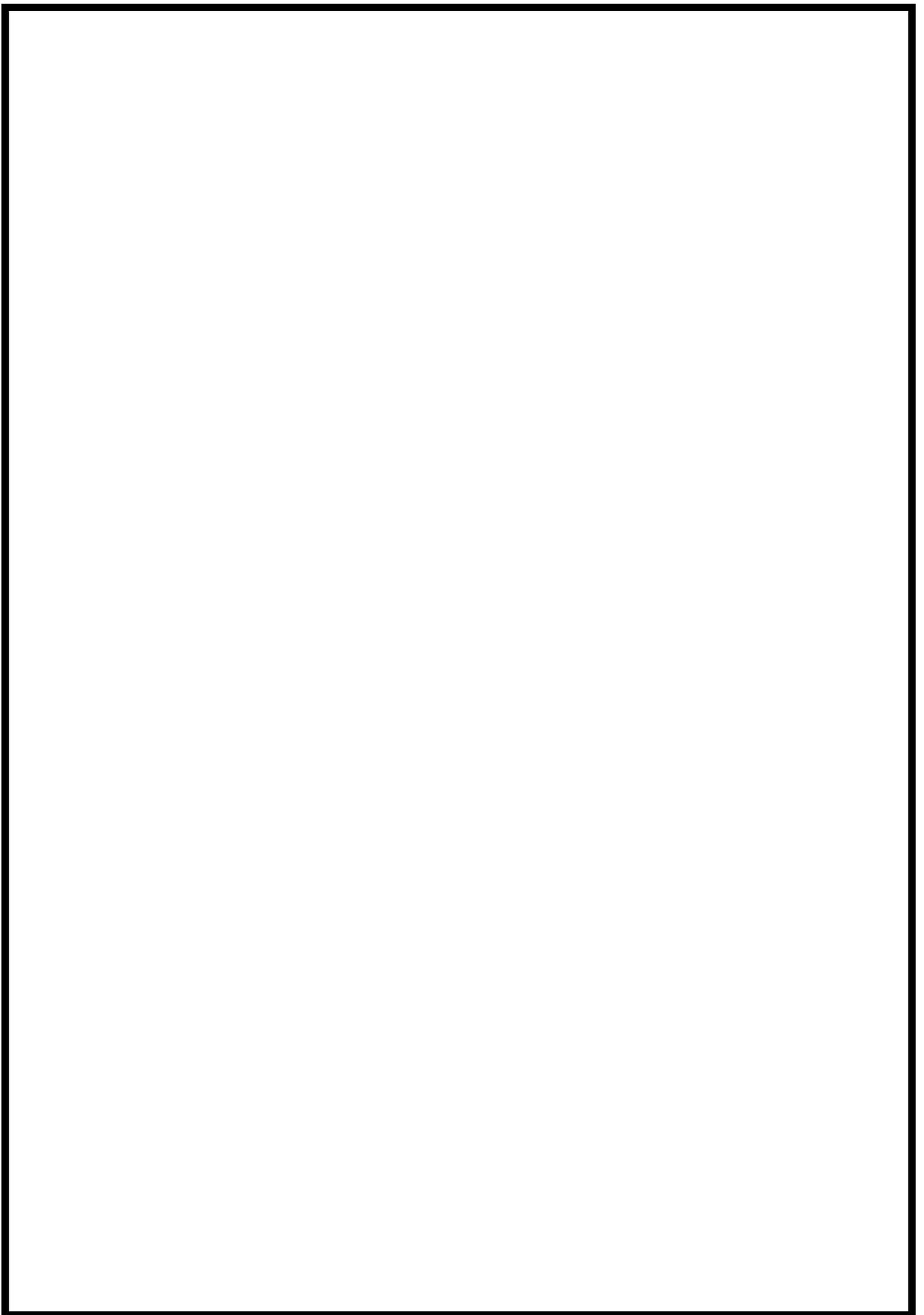
A tous mes cousins, mes voisins et tous mes amis.

Surtout BOUBEKER

*Je leurs dit avec ces simples mots, merci pour votre encouragement,
votre soutiens le long de se travaille*

Et que le dieu vous gardes pour nous.

Hanane & Ouissam



Liste des abréviations

ABTS	2,2'azinobis-(3-6 ethyle-benzothiazoline-6-sulfonate)
ADN	Acide désoxyribonucléique.
AINS	Anti inflammatoire non stéroïdien
AIS	Anti inflammatoire stéroïdien
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium
BHA	Butylé Hydrox Anisole
DO	Densité optique
EOR	Espèces oxygénées réactives.
EQ	Equivalent quarcithine
EAG	Equivalent acide gallique
Fe²⁺	Fer ferreux
Fe³⁺	Fer ferrique
GIGPx	Glutathion peroxydase digestive.
GPx	Glutathion peroxydase.
HOO-	radical acylperoxyde.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
HPGPx	Glutathion peroxydase localisé au niveau de la membrane cellulaire.
NADPH	Nicotinamide adinin dinucléotide phosphate
ONOOH	Reduced nicotinamid-adenine dinucleotide phosphate.
¹O₂	Oxygène singulier.
pGPx	Glutathion peroxydase plasmatique mitochondriale.
ROO*	Radicale pyroxyde.
ROOH	Hydro peroxyde Organique
SOD	superoxyde dismutase.
UV	Ultra violet

Sommaire

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction.....1

CHAPITRE I: Synthèse bibliographique

1. Généralités sur le genre <i>pinus</i>	3
1.1. Le pin.....	3
1.2. Composition chimique	5
1.3. Usage et activités biologiques	6
2. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène	6
2.1. Définition	6
2.2. Source des espèces réactives de l'oxygène.....	7
2.3. Principaux cibles des espèces réactives de l'oxygène	8
3.1. Le stress oxydant	9
3.2. Les pathologies liées au stress oxydant	9
4. Les antioxydants.....	10
5. Inflammation et anti-inflammatoires	11
5.1. Généralités sur l'inflammation	11
5.2. les anti-inflammatoires	13

CHAPITRE II: Matériel et méthodes

1. Préparation de l'extrait végétal.....	15
1.1. Préparation de la poudre végétale.....	15
1.2. Extraction au méthanol.....	15
2. Evaluation des taux des composés phénoliques	15
2.1. Dosage des phénols totaux	15
2.2. Dosage des flavonoïdes	16
3. Etude de l'activité antioxydant de l'extrait des graines de pin.....	17
3.1. Test d'activité scavenging du radical ABTS	17
3.2. Test de pouvoir réducteur	18
4. Etude in vitro de l'effet anti-thermodénaturant d'extrait méthanolique des graines de pin	18
4.1. Extraction de l'ovalbumine	18
4.2. Evaluation de l'activité anti-dénaturante de l'extrait méthanolique des graines de pin	19

CHAPITRE 03: Résultats et discussion

1. Taux d'extraction méthanolique.....	21
1.2. Taux en phénols totaux et en flavonoïdes	22
1.3. L'activité anti-radicalaire ABTS	23
2. Le pouvoir réducteur	23
3. Activités inhibitrice de la dénaturation de l'ovalbumine des extraits des grains de pin..	24

Conclusion et perspectives.....	29
--	-----------

Références bibliographiques.....	30
---	-----------

Annexes

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
01	Arbres de pin d'Alep	4
02	Arbres de pin Pignon	4
03	Protocole d'extraction des composés phénoliques	14
04	Mode opératoire de dosage des flavonoïdes	16
05	Taux des phénols totaux et de flavonoïdes en mg EAG/g d'extrait sec et en mgEQ/g d'extrait sec respectivement	21
06	Taux d'inhibition de radical ABTS à différentes concentrations de Trolox(a) et de l'extrait méthanolique des graines de pin (b)	23
07	variation des DO de l'activité réductrice de Fe ³⁺ pour différente concentration de la BHA (a) et d'extraits méthanoliques des grains de pin (b).	24
08	Variation des DO à 660 nm de l'ovalbumine incubée à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations de la protéine.	25
09	Variation des DO à 660 nm de l'ovalbumine incubée à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations d'éthanol.	26
10	Variation des DO à 660nm de l'ovalbumine à dilution 1/50 à différente température en fonction de temps.	27
11	Taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations des extraits méthanoliques des graines de pin et diclofenac.	28

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
01	Classification de genre <i>pinus</i>	3
02	Teneur des graines de quelques espèces de genre <i>pinus</i> en lipides, en acide gras, en protéines, en sucres, en polyphénols totaux et en flavonoïdes.	5
03	Principaux radicaux libre et leur structure chimique	6
04	Relations entre les maladies et le stress oxydant	9
05	Localisation et fonction des antioxydants enzymatique et non enzymatique	10
06	Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires	14

Introduction

Depuis l'antiquité, les Hommes cherchent dans la nature des plantes, pour soulager leurs maux et leurs douleurs. Le hasard, la religion, la superstition, la disponibilité de plante et l'expérience certainement, ont contribué dans la décision et le choix d'utiliser une plante par rapport à une autre, d'où l'apparition de la pratique de traitement par les plantes médicinales.

De nombreux chercheurs ont essayé d'expliquer l'action de ces plantes sur l'organisme. C'est alors que les chimistes ont réussi à isoler les principes actifs de certaines plantes.

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan. Des stratégies adoptées par la phytothérapie, pour prévenir ou guérir la maladie. Plusieurs plantes sont utilisées dans le monde, grâce à leur champ d'action et leur puissance et efficacité. Les métabolites secondaires qui constituent ces plantes sont responsables de leurs effets. Il s'agit en générale des composés phénoliques, tels que les polyphénols les flavonoïdes. Ces composés possèdent de nombreuses propriétés biologiques (anti inflammatoire, anti oxydant,...).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique, son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène. D'un autre côté, la surproduction des espèces réactives d'oxygènes au-delà des capacités antioxydants des systèmes biologiques donnent lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies. Cependant, l'utilisation des substances chimiques de synthèse anti-inflammatoire ou antioxydants est accompagnée toujours d'effets secondaires indésirables, alors que l'utilisation de composés phytochimiques s'avère utile et sans effets secondaires. Dans ce cadre, le travail que nous avons réalisé est dans le but de synthétiser dans ce manuscrit les constitutions suivant :

Chapitre I comportant une synthèse bibliographique sur les généralités de pin, les espèces réactives de l'oxygène, stress oxydant, les antioxydants, l'inflammation et les anti-inflammatoires.

- ✓ Chapitre II (Matériel et méthodes) décrivant la méthodologie suivie pour évaluer l'activité anti-inflammatoire et antioxydant d'extrait des graines de pin :

Introduction

- Extraction au méthanol 50% par macération.
- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.
- Test *In vitro* de l'activité antioxydant réalisé par deux méthodes: le pouvoir réducteur et le test anti radicalaire ABTS*⁺.
- Evaluation d'activité anti-inflammatoire *In vitro* d'extrait des graines de pin à différentes concentrations sur la dénaturation thermique d'ovalbumine.
- ✓ Chapitre III est consacré à la description des principaux résultats obtenus et leur discussion.
- ✓ Une conclusion à la fin du manuscrit récapitulant les principaux résultats obtenus, leurs limites et impacts et les perspectives qui en découlent.

Chapitre I :

Revue bibliographique

1. Généralités sur le genre *pinus*

1.1. Le pin

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 important des conifères, dont plus de centaine d'espèces on été décrites par plusieurs auteures (**Judd et al., 2002**). La classification de genre *pinus* est illustrée dans le (**Tableau 01**).

Tableau I : Classification de genre *pinus* (**Gaussen et al., 1982**)

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétale
Embranchement	Spermaphytes
Sous -Embranchement	Gymnosperms
Classe	Coniférophytes
Ordre	Pinales
Famille	Pinaceae
Genre	<i>Pinus</i>



❖ Description physique et habitat

Les espèces de genre *pinus* sont largement distribuées dans les zones tempérées de l'hémisphère. Ces espèces sont très fréquentes dans le bassin méditerrané. Elles sont à la fois thermophiles et héliophiles. Ces conifères préfèrent les soles bien drainés sur lesquels la croissance est plus rapide.

Les arbres de genre *pinus* peuvent attendre 40m de hauteur. Ils ont une longévité qui varie de 100 à 400 ans .On les distingue des autres arbres par leur aiguilles, dont la longueur varié entre 4 et 5 cm, groupé par deux ou trois. Les fruits de ces arbres sont des cônes de longueur variable entre 3 et 21 cm. Ils renferment des graines de différentes couleurs et longueurs selon l'espèce. Le genre *pinus* comporte plus d'une centaine

d'espèces Monoïques dont les caractéristiques morphologiques varient plus au moins d'une espèce à une autre.

- **Le pin d'Alep (*pinus halpensis*)** : le pin d'Alep on l'appelle parfois pin blanc.

Cette résineuse se trouve dans les régions côtières de la méditerranée. Elle est capable de s'adapter aux plusieurs types de sol et aux climats variés. Le pin d'Alep est un arbre de 5 à 20 m de hauteur et d'une longévité qui peut attendre 300 ans. Son tronc est tortueux avec une écorce de couleur gris argent. Ses aiguilles mesurent de 6 à 10 cm de longueur et sont groupé par deux. Ses fruits sont des cônes de 8 à 12 cm de longueur, qui renferment des graines environ 5 mm de longueur (**Figure 01**) (**Bernard, 2013**).

- **Le pin pignon (*pinus pinea*)** : le pin pignon ou pin parasol occupe généralement les plaines littorales et particulièrement les régions méditerranéennes. Il est sensible à la basse température et l'humidité.

Le pin pignon est un arbre de 30 m de hauteur et d'une longévité de 400 ans. Son tronc cylindrique nu et élevé avec une écorce gerçure-écailleuse. Ses aiguilles mesurent de 10 à 20 cm et sont groupé par deux. Ses fruits sont des cônes de 8 à 14 cm de long, qui renferment des grosses graines environ 2 cm (**Figure 01**) (**Sbay & HJIB, 2012**).

- **Le pin maritime (*pinus pinastre*)** : le pin maritime ou snober el bahr est un conifère largement distribué dans le bassin occidental de la méditerranée. Il demande un climat assez chaud et une bonne adaptation aux sols drainés. Ce résineux est un arbre de 40 m de hauteur et d'une longévité qui peut arriver à 500 ans. Son tronc est flexueux avec une écorce très épaisse de couleur gris pale. Ses aiguilles épaisse et rigide groupé par deux de 15 à 20 cm de long. Ses cônes mesurent de 10 à 18 cm de long qui renferment des graines de 8 à 10 mm.



Figure 01 : Arbres de pin d'Alep (Sbay et Hjib, 2012).



Figure 02 : Arbres de pin Pignon (Bernard, 2013).

1.2. Composition chimique

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de pin ont fait d'objet de plusieurs études phytochimiques dans le but d'identifier ses principes actifs. Ces études ont révélées que ces graines sont riches en plusieurs constituants hétérogènes tels que les lipides, les protéines, les sucres, et les composés phénoliques, dont la teneur varier d'une espèce à une autre selon les conditions géographiques et climatiques (**Tableau 02**).

Tableau II: Teneur des graines de quelques espèces de genre *pinus* en lipides, en acide gras, en protéines, en sucres, en polyphénols totaux et en flavonoïdes. (**cheikh-rouhou et al., 2006 ; Nergiz et Domnez, 2004 ; kadri et al., 2004**).

Taux des lipides en (%)			
<i>Pinus pinea</i>	<i>Pinus halpensis</i>	<i>Pinus pinastre</i>	<i>Pinus canariensis</i>
44,9	43.3	24.15	23.92
Taux en acide gras (g/100g)			
Constituants	<i>Pinus pinea</i>	<i>Pinus halpensis</i>	<i>Pinus pinastre</i>
Acide oléique	38.6	27.3	18.1
Acide linoléique	47.6	48.8	55.9
Acide palmitique	6.49	8.75	3.6
Taux en protéines en (%)			
<i>Pinus pinea</i>	<i>Pinus halpensis</i>	<i>Pinus pinastre</i>	<i>Pinus canariensis</i>
31.6	26.62	16.25	16.71
Taux en sucres (%)			
<i>Pinus pinea</i>	<i>Pinus halpensis</i>	<i>Pinus pinastre</i>	<i>Pinus canariensis</i>
13,9	5,55	2.37	3.67
Taux en phénols totaux (mg/g)			
<i>Pinus pinea</i>	<i>Pinus halpensis</i>	<i>Pinus pinastre</i>	<i>Pinus canariensis</i>
7.99	3.71	9.23	9.67
Taux en flavonoïdes (mg/g)			
<i>Pinus pinea</i>	<i>Pinus halpensis</i>	<i>Pinus pinastre</i>	<i>Pinus canariensis</i>
1.42	2,17	1.42	0.75

I.3. Usage et activités biologiques

Les principales utilisations de pin sont liées à la production de bois comme bois d'industrie ainsi que pour la charpente ou la menuiserie. Le pin utilisé aussi pour la protection des sols. Il est utilisé dans le domaine cosmétique expliqué par sa richesse en acide gras, vitamine E, polyphénols et antioxydants naturelles. Elles sont aussi utilisées dans le domaine agroalimentaire (la pâtisserie) (Colonel et al., 2011).

Plusieurs études indiquent que les métabolites des espèces de genre *pinus* présentent divers activités biologique. Ces travaux qui ont été réalisés dans ce contexte, concernent les graines qui présentent des activités antioxydant et anti inflammatoire 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 anti cancéreuse. Ainsi l'écorce possède une activité anti inflammatoire et antioxydant.

2. Radicaux libres et espèces réactive de l'oxygène

2.1. Définition

- Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atome ou molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbitale externe.

- Espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont une famille d'entités chimiques regroupent des dérivés radicalaires et des dérivés non radicalaires. Les ERO susceptibles de former dans la cellule sont illustrées dans le (Tableau 03). (Goudable & Favier, 1997).

Tableau II : Principaux radicaux libre et leur structure chimique. (Favier, 1997).

Type	Radical libres	Structure chimique
Dérivés radicalaires	Radical hydroxyle	OH•
	Radical hydroperoxyde	HOO•
	Radical peroxyde	ROO•
	Radical alkoxyde	RO•
Dérivés non radicalaires	Peroxyde d'hydrogène*	H ₂ O ₂
	Peroxynitrite	ONOO•
	Anion superoxyde	O ₂ •-

2.2. Source des espèces réactives de l'oxygène

- Les ERO sont produit à l'intérieure (sources endogènes) et à l'extérieure (sources exogènes) des cellules par différentes mécanismes.

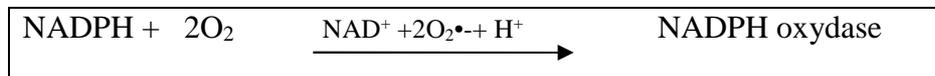
❖ Sources exogènes

- Les radiations X ou gamma : Ces radiations sont capable par différents mécanismes de faire apparaitre des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux.

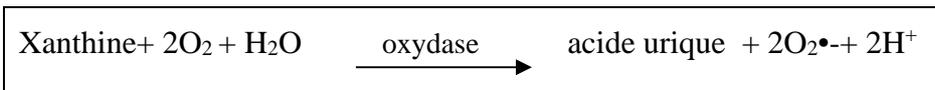
- Les rayonnements UV : Ils sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation des photosensibilisants. Autre sources telles que les médicaments et les xinobiotiques peuvent contribuer à la production des ERO qui se forment comme un des produits de leurs métabolismes (Valko et al., 2007).

❖ Sources endogènes

Au cours de métabolisme cellulaire, la production d'énergie via la respiration mitochondriale, dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaire, Cependant une faible quantité de O_2 s'échappe. le contact de cette dernière et certain protéine de system respiratoire a conséquence de production d'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. cette réaction est catalysé par NADPH oxydase membranaire.



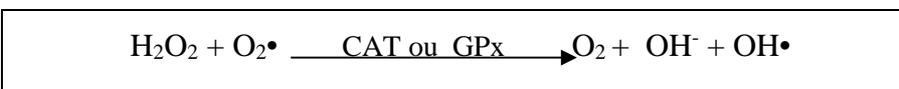
- Une production de peroxyde ($O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2) à lieu aussi dans le peroxyosome lors de l'ischémie/reperfusion.



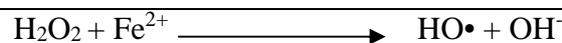
- La dismutation de $O_2^{\bullet-}$ spontanée, ou catalysé par la supeoxyde desmutase (est la source majeure de H_2O_2 . (Favier, 2006 ; Leverage, 2009).



- L' H_2O_2 a la capacité de généré les radicaux hautement réactive, selon la réaction suivant :



- Le H₂O₂ a aussi la capacité d'oxyder les composés aromatiques, en présence de fer selon la réaction de Fenton (**Favier, 1997**).



2.3. Principaux cibles des ERO

Les ERO jouent un rôle important dans le bon déroulement de la réaction immunitaire, particulièrement dans la phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages et des polynucléaires. Les ERO participent à la destruction par oxydation l'ensemble des composés bactériens. Les ERO interviennent aussi dans la régulation et la communication cellulaire. D'autres cibles biologiques susceptibles aux attaques radicalaires lors d'un stress oxydant citons (**Leverve, 2009**).

- **Les lipides** : les acides gras polyinsaturés des lipides sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle OH, qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons de ces acides gras. Ceci conduit à un processus de peroxydation lipidique (**Pasquier, 1995**).

- **L'ADN** : au niveau de l'ADN les radicaux libres peuvent induire des effets oxydatifs et mutagènes ou un arrêt de réplication. Ils provoquent des altérations de base de pontage ADN-Protéine ou des ruptures de brin (**Pasquier, 1995**).

- **Les protéines** : 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**).

3.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant est l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, qui due à un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants. Ce processus peut être causé par plusieurs facteurs tels que les déficits nutritionnels en antioxydants comme la vitamine E, la vitamine C et les oligo-éléments, ce phénomène est doublé aussi par des autres facteurs pro oxydants tels que le tabac, l'alcool, les métaux, ainsi qu'une diminution des antioxydants.

3.2. Les pathologies liées au stress oxydant

• De nombreuses études, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plusieurs pathologies humaines, La relation entre le stress oxydant et les maladies sont cités dans le **(tableau 04)**.

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

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

4. Les antioxydants

4.1. Définition

Les antioxydants sont définis par **Halliwell, (1999)**, comme « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit

l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine. Selon le tableau suivant (Orban, 2011).

Tableau IV : Localisation et fonction des antioxydants enzymatique et non enzymatique. (Orban, 2011 ; Favier, 1997).

	L'antioxydant	Localisation et fonction
Enzymatique	Le superoxyde dismutase (SOD)	localisés dans le cytoplasme, la mitochondrie et les milieux extra cellulaires. , Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) et en Oxygène. Selon la réaction suivant :
	Catalase (CAT)	localiser dan la mitochondrie, le peroxysome et le cytoplasme. Elle est capable de transformé le peroxyde d'hydrogène, produit généralement par la SOD en eau et oxygène moléculaire.
	Glutathion peroxydase (GPx)	localise dans le cytosol (cGPx), la matrice Mitochondriale, le plasma (pGPx) et au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx).
Non enzymatique	La vitamine E	Elle est présente dans tous les organes, à l'exception du cerveau. Elle empêche La réaction de peroxydation lipidique
	La vitamineC	qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piégé directement l'anion super oxyde (O ₂),le radical hydroxyle (OH) l'oxygène singulier et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau, Elle permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E
Non enzymatique	Les caroténoïdes	comportent nombreuses doubles liaisons conjuguées, au sien de leur structure, qui lui offre une activité antioxydant. Assurés par trois mécanismes, soi par l'abstraction d'hydrogène, transfère d'électrons et addition de radicale.
	Les polyphénols	Sont des molécules de métabolisme secondaire ils .sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduise les radicaux libres
	Les flavonoïdes	Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres, comme O ₂ [*] , le OH [*] , pyroxyle et alotoxyle, par transfère de l'hydrogène.

5- Inflammation et anti-inflammatoires

5-1- Généralités sur l'inflammation

L'hémostase est une propriété fondamentale de système biologique, regroupe différents mécanismes, qui assure leur préservation à des saignements spontanés ou développés, ainsi que la préservation de leur stabilité et régulation. Cette fonction physiologique essentielle de la vie dépend plusieurs processus citant l'inflammation.

L'inflammation : nom Femina emprunté au latin (inflammation « action d'incendier, incendies »). C'est un phénomène de défense non spécifique, répondre à une agression, soit endogène, telle que (les cellules endommagées, les réactions immunitaires, maladies auto-immune, les endotoxines de bactéries...), soit exogène telle que, les agents physiques (brûlure, gelures, radiations...), les agents chimiques (produit cosmétique), les agents microbiens (les exotoxines de bactéries, les virus...).

L'inflammation peut être locale ou générale, qui vis à maintenir l'intégrité de soit. Elle est responsable d'un syndrome clinique et biologique.

Dans les deux circonstances, endogènes et exogènes les systèmes de défenses mise en jeu sont les mêmes, mais le poids moléculaire, l'intensité et la durée de l'inflammation modifient et conditionne le type d'inflammation en distinguant l'inflammation aiguë et celle de chronique (**Barton, 2008**).

- **Inflammation aiguë**

L'inflammation aiguë est caractérisée par quatre phénomènes typiques, qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle est de courte durée. L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases : une phase vasculaire immédiate, une phase cellulaires et une phase de résolution et cicatrisation. Elle est causée par l'activation de différents médiateurs et cellules spécialisés dans le site infecter (**Jacques et al., 1988**).

- **Inflammation chronique**

Elle est caractériser par une réponse immunitaire adaptative, elle fait intervenir des cellules lymphocytaires spécifiques sur l'endothélium Vasculaire, qui permettant leur transmigration dans les compartiments extravasculaires. Par l'apparition de molécules d'adhésion, sur la surface des cellules endothéliales. Elle est d'une longue durée et qui à l'origine de différentes maladies chroniques, telle que Rhumatisme Articulaires et de la polyarthrite rhumatoïde. La réaction inflammatoire n'est pas une réaction immunitaire,

mais est un élément primordiale de l'immunité non spécifique, elle permet de mise en place d'une défense à large spectre, par l'intervention de system de défense inné, comme premier ligne avant que la Les Anti-inflammatoires éponse immunitaire adaptative puisse intervenir (**Cavaillon, 1993**).

- **Les médiateurs de l'inflammation**

Quelle que soit la nature de pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généreux et communs. Ce processus fait intervenir des cellules immunitaires (Les granulocytes, les mastocytes et les macrophages, les monocytes, les mastocytes, les cellules endothéliales, les lymphocytes) et des médiateurs chimiques (médiateurs plasmatiques et médiateurs cellulaires). L'ensemble de ces éléments a pour bute d'éliminé l'agent pathogène et de réparation tissulaire (**Kumar et al., 2007**).

- **Médiateurs plasmatiques**

Les médiateurs plasmatiques sont présents dans le plasma sous la forme de précurseurs qui doivent être activés pour acquérir leurs propriétés. En effet Le plasma présent quatre systèmes de défenses inactives à l'état physiologique : le system des kinines, le system de complément, le system de coagulation et le system protéolytique. Lorsque survient une lésion tissulaires ces quatre systèmes activés déclenchant des cascades enzymatiques qui induisant une augmentation de la perméabilité vasculaire et de taux de plasmine (**Charles et al., 2010**).

- **Médiateurs cellulaires**

Les médiateurs cellulaires sont soit préformés et séquestrés dans des Granules intracellulaires, soit synthétisé en réponse à un stimulus .les médiateurs cellulaires sont principalement libéré par des mastocytes , des plaquettes sanguines et par les leucocytes .parmi ces médiateurs cellulaires en trouves des cytokines ,des facteurs de croissance , des phospholipide membranaires ,les enzymes lysosomiales et les espèces réactive de l'oxygène (**Kumar et al., 2007**).

5-2. Anti-inflammatoire

Les anti-inflammatoires sont des substances de différentes origines a pour but de réduire la réponse inflammatoire de longue durée, ces substances se divisent en trois classes ; les anti-inflammatoires stéroïdiens, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les anti-inflammatoires d'origines végétales.

➤ **Anti-inflammatoires stéroïdiens**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS), constituent une vaste famille de médicaments dérivés de cortisol, principale glucocorticoïde surrénaliens. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées de cholestérols, sous l'action de l'hormone adréno-corticotrope (ACTH) de l'hypophyse. Les AIS sont responsables de nombreux effets biologiques, notamment sur l'inflammation, soit en réprimant l'expression de gène pro-inflammatoire, l'induction de l'expression de gène anti-inflammatoire, ou inhibent la production des prostaglandines (**Weill et Batteux, 2003**).

➤ **Anti-inflammatoires non stéroïdiens**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), agissent en empêchant la formation de prostaglandine responsable de l'inflammation. Ils sont efficaces contre la douleur et la fièvre. Leur action anti-inflammatoire n'est efficace qu'à forte dose, et par ce fait sont considérés comme l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde. Ils sont caractérisés par une forte fixation aux protéines plasmatiques et une large distribution tissulaires. Son rôle principal c'est l'inhibition de la cyclooxygénase (enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique) (**Krzesinski et Piront, 2002**).

La prescription des AINS et AIS est de plus en plus importante, vu leur efficacité dans le cas des douleurs. Mais de nombreux effets indésirables, peuvent être enjointes à l'utilisation de cette classe thérapeutique. Pour cette raison il est favorable de retourner à la médecine traditionnelle à base de plantes médicinales, afin de bien exploiter ces composés bioactifs, notamment les composés phénoliques, qui sont dotés d'un effet anti-inflammatoire. Le tableau suivant montre les effets anti-inflammatoires de quelques plantes médicinales.

Tableau VI : Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires
(Barnes, 1998).

Nom scientifique	Nom commun	Famille	Partie utilisé	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Gingembre	Zingiberaceae	Rhizome	Arthrose, douleurs rhumatismales.
<i>Helleborus orientalis</i>	Lenten-ros	Ranunculaceae	Racines	Œdèmes, douleurs rhumatismales
<i>Urticadiaca</i>	Ortie	Urticaceae	Feuilles, Racines	Rhinite allergique, eczéma goutte.
<i>Laurocerasus officinalis</i>	Laurier	Rosaceae	Feuilles	Fièvre, douleurs d'estomac

Chapitre II :

Matériel et méthodes

1. Préparation de l'extrait végétal

1.1. Préparation de la poudre végétale

Le matériel végétal qui est constitué des graines de pin, a été acheté chez un herboriste de la ville de Bejaïa. L'espèce n'a pas été identifiée. Les graines sont bien nettoyées, lavées avec de l'eau, puis séchées dans l'étuve. Après séchage, les graines sont broyées à l'aide d'un mixeur électrique. Le produit est tamisé afin d'obtenir une poudre homogène. Cette poudre est ensuite conservée dans un bocal en verre hermétiquement fermé.

1.2. Extraction au méthanol

L'extraction des composés phénoliques de la poudre des graines de pin préparée a été réalisée par macération au méthanol 50% selon la procédure décrite par **Tawaha et al., (2007)**. La méthode d'extraction est illustrée dans la figure suivante (**Figure 03**).

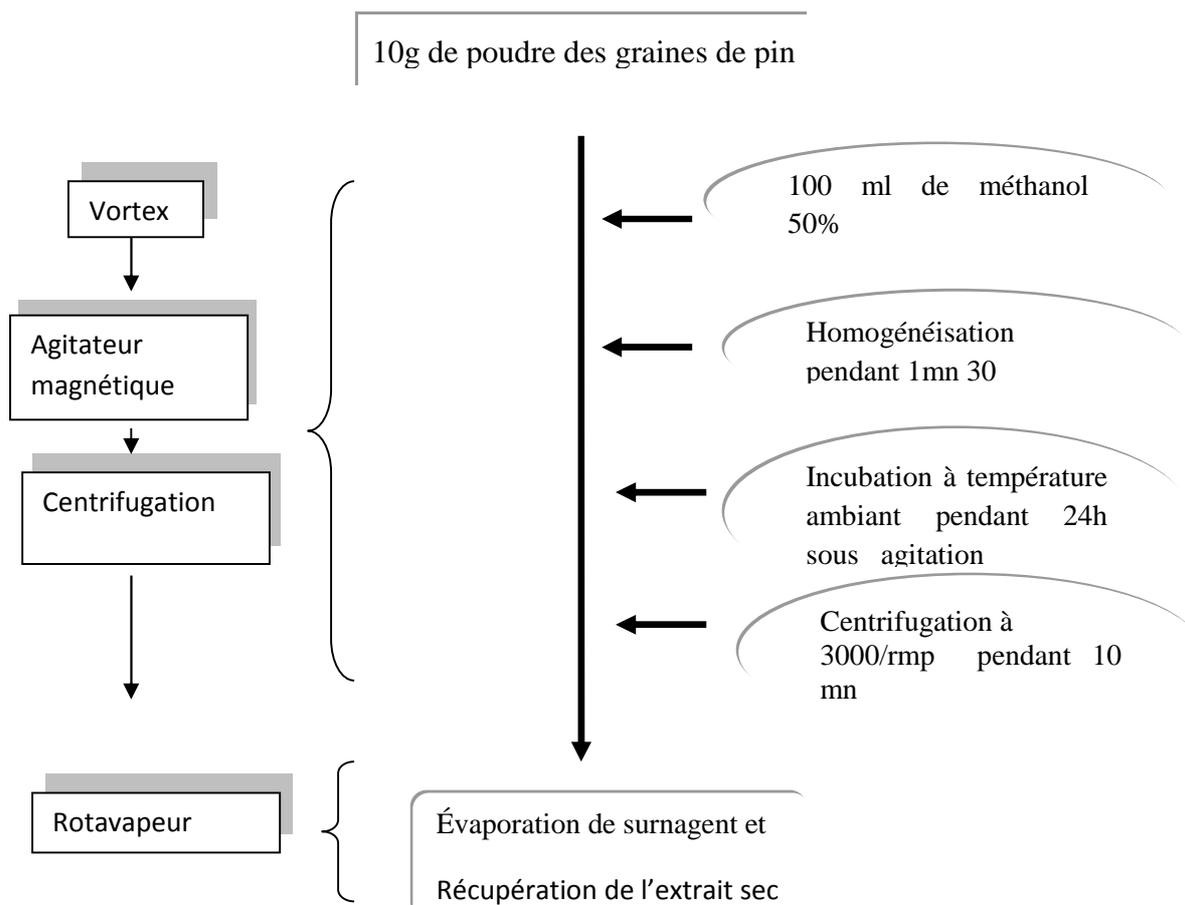


Figure 03 : Protocole d'extraction des composés phénoliques (**Tawaha et al., 2007**).

❖ Expression du rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue après évaporation du solvant et la masse de la poudre végétale utilisée. Ce rendement est calculé par l'équation suivant:

$$R(\%) = (M1 - M0 / M) \times 100$$

Ou':

R(%): Rendement en % ;

M0: Masse de bicher vide ;

M1: Masse de bicher après évaporation ;

M: Masse de matière sèche.

2. Evaluation des taux des composés phénoliques**2.1. Dosage des polyphénols totaux****❖ Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit en présence des phénols totaux en un mélange d'oxydes bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleu produite est proportionnelle au taux des composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel. Cette coloration possède une absorption maximum aux environs de 750 à 760 nm (**Ryan ,2013**).

❖ Mode opératoire

Le protocole que nous avons suivi pour le dosage des polyphénols totaux contenus dans nos extraits est celui décrit par (**Ryan, 2013**). Un volume de 200 µl de l'extrait des graines de pin solubilisé dans l'éthanol (1 mg/ml) a été mélangé avec 1.5 ml de réactif Folin-Cioclatau (0.1 N). Le mélange a été incubé pendant 5 mn à l'obscurité puis 1,5 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 6 % lui a été additionnés. Après

agitation et incubation à température ambiante pendant 2 heures, l'absorbance (Abs) a été mesuré à 765nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions mais ne contenant pas d'extrait végétale. Les mesures ont été réalisées trois fois de façon indépendante

❖ Expression de résultats

La concentration des phénols totaux a été déterminée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec calculé en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec l'acide gallique comme phénol standard.

2.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes d'extrait méthanolique des graines de pin est élaborée par la méthode colorimétrique de **Dejdanne et al., (2006)**.

❖ Le principe de la méthode

La méthode colorimétrique de dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dans l'absorption maximal et la longueur d'onde à 448 nm, contre un témoin préparé dans les mêmes conditions et ne contenant pas l'extrait des graines de pin. Le protocole de dosage est présenté dans la figure suivante.

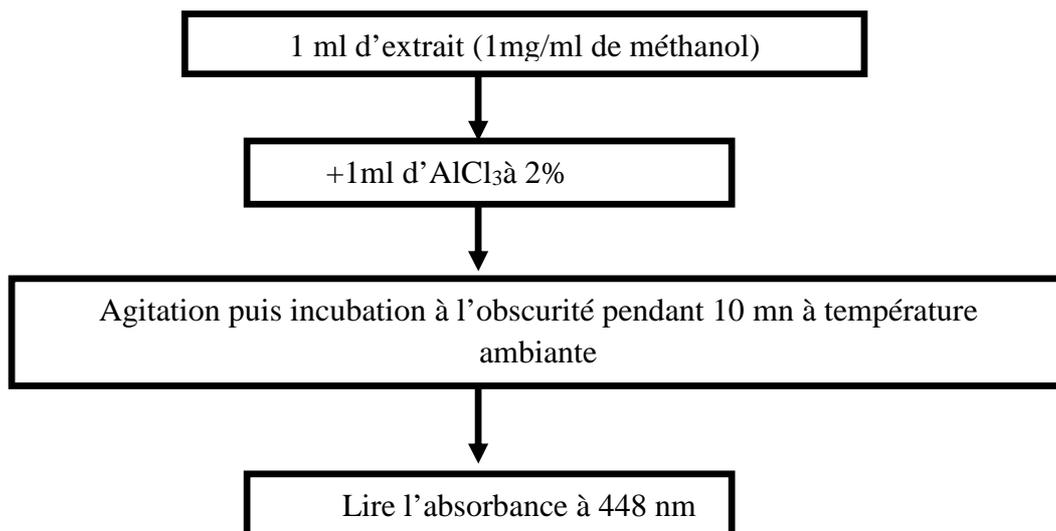


Figure 06 : Mode opératoire de dosage des flavonoïdes (**Dejdanne et al., 2006**).

❖ Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes présents dans l'extrait est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage, établie dans les mêmes conditions avec la quercétine et est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme de l'extrait sec (mg EQ/g d'extrait sec).

3. Etude de l'activité antioxydant de l'extrait des graines de pin**3.1. Test d'activité scavenging du radical ABTS⁺****❖ Principe**

Ce test est basé sur la réduction de radical libre ABTS^{*+} qui présente une coloration bleu verte sombre, par des molécules à activité antioxydant. La forme réduite confère une décoloration jaune pale. L'intensité de la décoloration, dépendent de la nature et la concentration de la substance anti radicalaire.

❖ Mode opératoire

- Le radical d'ABTS a été préparé en mélangeant 1.54 mg d'ABTS⁺ avec 2.5 mg du persulfate de potassium, le mélange est conservé à l'obscurité pendant 16h avant l'utilisation. La solution obtenue est diluée pour obtenir une absorbance de 0.7 à 734 nm.

- un volume de 2 ml de la solution diluée est d'une part ajoutée à un volume de 20µl d'extrait méthanolique des graines de pin à différentes concentrations (100, 200, 400, 500, 800 et 1000 µg/ml), et d'autre part, à 20µL de Trolox utilisé comme standard à différentes concentrations (10,20, 40, 50,80 et 100 µg/ml) le blanc contient tout les réactifs sauf l'extrait à tester. Après 6 mn d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 734nm (Djeridane et al., 2006).

❖ Expression des résultats

L'activité antioxydant a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radicale ABTS⁺ selon la formule suivante :

$$\text{(\% d'inhibition du ABTS}^+\text{)} = (\text{Ac} - \text{Ae} / \text{Ac}). 100$$

Ac : Absorbance du contrôle ;

Ae : Absorbance de l'échantillon.

3.2. Test de pouvoir réducteur

❖ Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Le but de cette technique est de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical Hydroxyle par la réaction de Fenton (Stéphanie et al., 2009).

❖ Mode opératoire

- 1ml d'extrait méthanolique des graines de pin à différentes concentrations (100, 200, 400, 600, 800 et 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est mélangé avec 1ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 1ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min, ensuite 1ml d'acide trichloracétique à 10% est ajouté au milieu réactionnel. Les solutions sont centrifugées à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combiné avec 1,5ml d'eau distillée et 1ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 (Chlorure ferrique à 0,1%).
- la BHA a été utilisée comme un contrôle standard. Les absorbance ont été mesurées à 700 nm contre un témoin contenant tout les réactifs sauf l'extrait. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

❖ Expression des résultats

Le pouvoir réducteur est déterminé par la variation des DO à 700 nm en fonction de la concentration.

4. Etude *In vitro* de l'effet anti-thérmodénaturant d'extrait méthanolique des graines du pin.

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire d'extrait des graines de pin, un test par la méthode turbidimétrique a été réalisée *In vitro* contenant l'ovalbumine extraite du blanc d'œuf utilisé comme modèle d'étude (Adarsh Verma et al., 2011).

4.1. Extraction de l'ovalbumine

Les œufs ont été achetés d'une supérette d'alimentation puis nettoyés avec de l'eau distillée. L'extraction de l'ovalbumine à partir du blanc d'œuf de poule a été réalisée suivant le protocole décrit par **Anderson, (2013)**. Dans un bécher mis dans un bain de glaces, un blanc d'œuf a été mélangé à 50 ml du tampon phosphate (0.1M, pH=6.6) et homogénéisé sous agitation magnétique pendant 5 mn. L'homogénat obtenu d'aspect trouble a été ensuite centrifugé à 3000 rpm (4°C) pendant 5 mn, puis filtré sur bande à gaz pour éliminer les globulines précipitées. Le filtrat obtenu est riche en ovalbumine, a été ensuite fractionné en des aliquotes de 3 ml et congelé à 20°C. Après l'extraction on a testé l'effet de trois paramètres (la concentration, température, éthanol) sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine.

❖ Effet de la concentration d'ovalbumine en fonction de temps

La cinétique de dénaturation de l'ovalbumine à différentes dilutions (1/25, 1/50, 1/75, 1/100.) a été suivie en fonction de temps d'incubation de 0 -60 mn à une température de 70°C.

❖ Effet de température

Pour évaluer l'effet de la température sur la dénaturation de l'ovalbumine, on a réalisé un test avec la dilution 1/50 de l'ovalbumine aux températures 60°C, 70°C et 80°C. Les densités optiques sont mesurées à 660 nm.

❖ Effet de l'éthanol

L'effet de l'éthanol à différentes concentrations (0, 2,5, 5, 7,5 10%), sur la dénaturation de l'ovalbumine a été suivie dans les mêmes conditions précédemment citées avec une dilution de l'extrait ovalbumine de 1/50.

4.3. Mesure de l'activité anti-thérmodénaturation de l'extrait méthanolique des graines de pin

❖ Mode opératoire

20 mg d'extrait de grain de pin a été solubilisé dans 2 ml d'éthanol 50%, puis différentes concentrations de cette solution (0, 100,200 ,400 µg/ml) ont été mélangées avec 7,6 ml d'une solution d'ovalbumine diluée à 1/50 dans un tampon phosphate (0,1 M,

pH=6,6), le mélange est incubé dans un bain marie à 70°C. Les densités optiques sont lues à 660nm (Adarsh Verma *et al.*, 2011).

❖ **Expression des résultats**

Le taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine à 70°C est exprimé par l'expression suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = (\Delta\text{Absc} - \Delta\text{Abs} / \Delta\text{Absc}) \cdot 100$$

Où :

Δabsc : variation d'Absorbance à 660nm de l'ovalbumine en absence d'extrait des graines de pin (contrôle) ;

ΔabsE : variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine en présence de l'extrait de pins (essai).

Chapitre III :

Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction méthanolique

Les résultats de rendement de notre extrait méthanolique des graines de pin, après différentes étapes d'extraction (**figure 4**) est de 30% (30mg d'extrait sec /g matières sèche). En comparant aux résultats des travaux de **lantto et al., (2009)** et **Su et al.,2009)** sur les graines de *Pinus sibirica* et *Pinus koraiensis* dont les rendements d'extraction sont respectivement (21.5mg/g) et (35mg/g), on remarque que le rendement de notre extrait est inférieur de celui de *Pinus koraiensis* et supérieur à celui de *Pinus sibirica* .

Cette différence entre les rendements d'extraction des composés phénoliques entre les différentes espèces de même genre peut être due à plusieurs facteurs physico chimiques, aussi à l'espèce. La maturité des graines joue un rôle primordial dans le rendement d'extraction. La taille homogène de la poudre fine peut aussi influencer sur le rendement d'extraction, cette forme fine permet d'avoir une meilleure interaction entre le solvant et la surface des particules. Cette différence peut être due aussi à la nature de solvant d'extraction utilisé, dont l'extraction avec méthanol /eau (v/v) donne un meilleur rendement (**Silva et al., 2007**).

2. Taux en phénols totaux et en flavonoïdes

L'analyse quantitative en phénols totaux et en flavonoïdes, montre que l'extrait méthanolique des graines de pin contient des taux en phénols totaux et en flavonoïde de 11.56mgEAG/g d'extrait sec et 3.18mgEQ/g d'extrait sec respectivement (**Figure 05**).

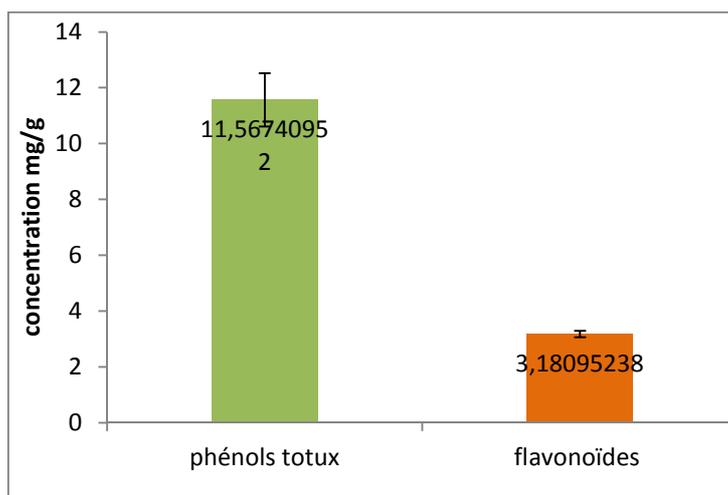


Figure 05 : Taux des phénols totaux et de flavonoïdes en mg EAG/100gd'extrait sec et en mgEQ/g d'extrait sec respectivement.

Les taux de métabolites secondaires polyphénols totaux et flavonoïdes des graines de *Pinus canariensis* et *Pinus pinastre*, obtenus par **Kadri et al., (2014)**, sont de même ordre de

grandeur des taux que nous avons obtenus 11,56 mg EAG/g d'extrait sec de phénols totaux et 3,18mg EQ/g d'extrait sec de flavonoïdes. En effet, **Kadri et al., (2014)** ont montré que les extraits de *Pinus canariensis* et *Pinus pinastre*, contiennent respectivement 7,67mg et 9,23 en mg AG/ g d'extrait sec en polyphénols totaux et de 0,75 et 1,42 mgEQ/g d'extrait sec en flavonoïdes. Par contre, pour les graines de *Pinus pinea*, il a été démontré que les taux de phénols totaux de leurs extraits méthanoliques sont largement plus faibles de 0,23 mg EAG/g d'extrait sec (**Nasri et al., 2004**).

La variation des taux en phénols totaux 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 ce qui pourrait expliquer le cas des graines de *Pinus pinea* qui présentent des faibles teneurs en phénols totaux. Autres auteurs ont mis en évidence d'autres paramètres sur la teneur en phénols totaux et flavonoïdes comme l'état des graines et les paramètres d'extraction (**Servili et al., 2004**).

3. Activité anti-radicalaire ABTS⁺

Pour étudier l'activité anti-radicalaire, le test de l'ABTS⁺ a été utilisé. Les résultats de l'activité anti radicalaire obtenus pour le Trolox, phénol de synthèse utilisé comme référence et pour l'extrait de pin sont représentés dans la **figure 06**.

D'après ces résultats, qu'ils soient pour le Trolox ou pour l'extrait de plante, on observe que l'activité anti radicalaire évolue avec la concentration. A concentration égale de 100µg/ml, le taux d'inhibition du radical ABTS pour le Trolox est d'environ 70%, par contre pour l'extrait de plante, il n'est seulement que de 15%. En estimant l'IC₅₀, l'extrait de plante est très peu efficace par rapport au Trolox. En effet, IC₅₀ pour le Trolox est de 70µg/ml alors que pour l'extrait de pin il est largement supérieur à 1mg/ml.

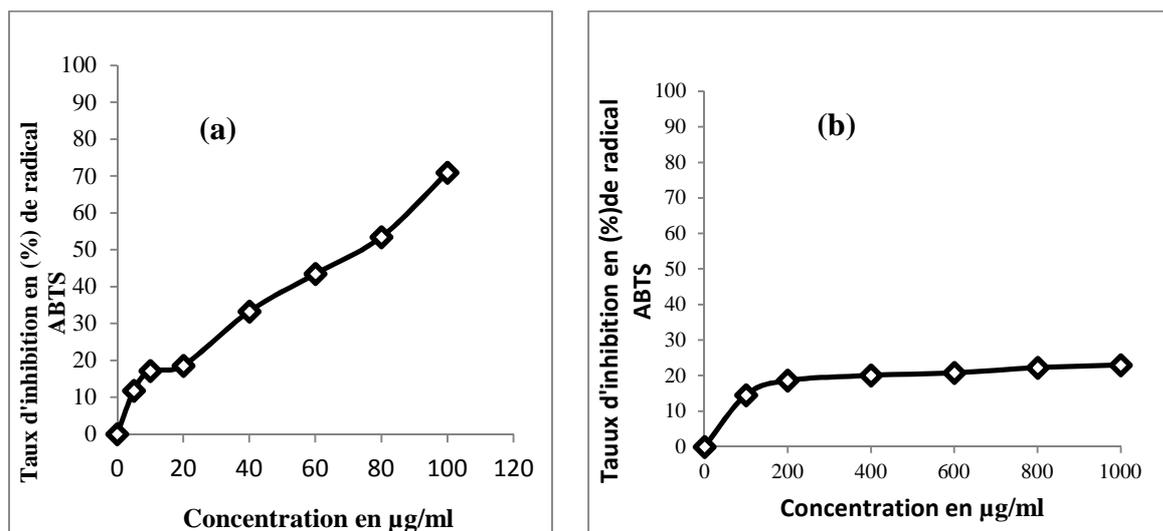


Figure : Taux d'inhibition de radical ABTS*+ à différentes concentrations de Trolox (a) et de l'extrait méthanolique des graines de pin (b).

Les résultats présentés dans la **Figure 06** montrent que l'extrait méthanolique des graines de pin contient des composés antioxydants capables de réduire le radical ABTS⁺. En comparant les résultats enregistrés par (Stephanie et al., 2009) sur l'activité inhibitrice de radical ABTS⁺ d'extrait d'écorce de pin maritime qui est de l'ordre de 76,71%, on remarque que leur activité est supérieure à celle trouvée par notre extrait. Cependant, si on compare notre résultat avec l'effet inhibiteur de radical ABTS⁺ des extrais méthanoliques des graines de *Abelmoschus moschatus* (Ambrette) qui possède un taux d'inhibition de 1,48% (Stephanie et al., 2009). Ce dernier montre une activité inférieure à celle trouvée dans notre extrait. La différence de taux d'inhibition de radical ABTS⁺ de notre extrait des graines de pin, des grains du *Abelmoschus Moschatus* et de celui de l'écorce de pin maritime peut être due à la différence des espèces, l'organe étudié, ainsi que leur genre. En effet, l'activité antioxydante des plantes due à leur teneur en extrais phénolique et leur composition en métabolites secondaires qui peut expliquer la variation des taux d'inhibition de radical ABTS⁺. Ces antioxydants peuvent être affectés par plusieurs facteurs tels que les conditions de la croissance et la maturité des organes étudiés. La différence des taux d'inhibition peut être attribuée aussi à la variation des conditions de manipulation, la qualité et la concentration du radical utilisé dans le test antioxydant et aux conditions expérimentales.

4. Le pouvoir réducteur

Pour évaluer le pouvoir réducteur d'extrait méthanolique des graines de pin, on a suivi la réduction de Fe³⁺ par un électron provenant de l'extrait. Les résultats obtenus par la BHA,

polyphénols synthétiques, utilisée comme contrôle standard et ceux l'extrait de pin sont représentés dans la **figure 07**.

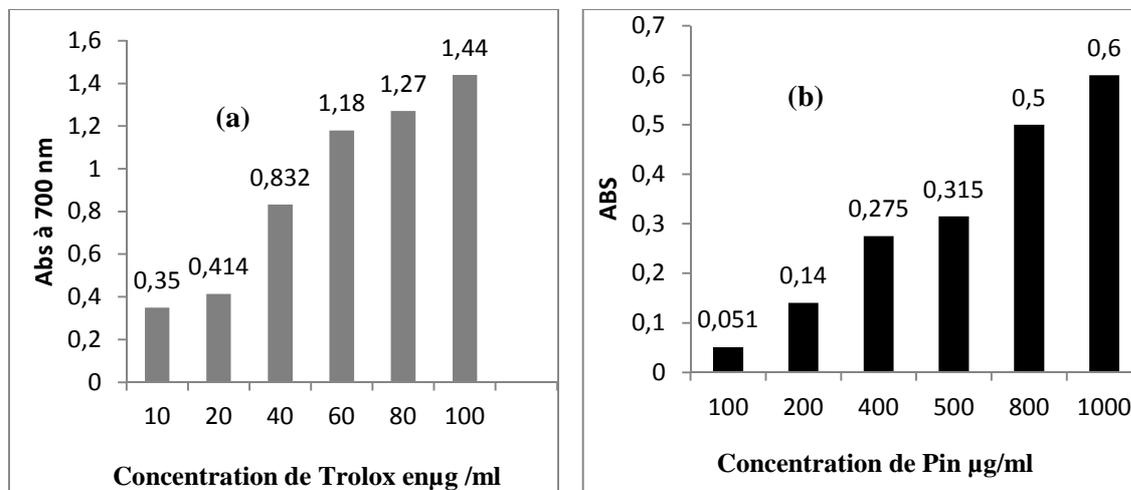


Figure 07: variation des DO de l'activité réductrice de Fe^{3+} pour différente concentration de la BHA (a) et de l'extrait méthanolique des grains de pin (b).

D'après les résultats obtenus (**Figure 07**), on remarque que la capacité réductrice de Fe^{3+} est proportionnelle à la concentration, qu'il soit pour la BHA ou par l'extrait de graines de pin. Si on compare le pouvoir réducteur d'extrait de graines de pin avec celui de BHA on remarque que leur pouvoir réducteur a une concentration de 100g/m de la BHA présent une DO égale à 1.44, et de 0,051 pour l'extrait, cette DO est inférieur à celle enregistrée par la BHA. La variation de pouvoir réducteur de BHA et celle d'extrait peut être due à la composition quantitative est qualitative des antioxydants présentes dans les graines de pin.

5. Activités inhibitrice de la dénaturation de l'ovalbumine des extraits des grains de pin

Les protéines sont des constituants indispensables à l'organisme humain. Elles assurent des fonctions physiologiques essentielles. En effet, le dysfonctionnement d'une protéine dans l'organisme, induit par des agents physiques ou chimiques constituant une des causes d'induction d'un processus inflammatoire. Dans le but de maintenir la stabilité des protéines et de minimiser ses dommages dans l'organisme, on a examiné l'effet d'extrait des graines de pin sur la thermodénaturation des protéines globulaires. La protéine modèle pour ce travail, est l'albumine sérique humaine. Mais en raison de non disponibilité en quantité suffisante de cette protéine, nous avons utilisé l'ovalbumine de blanc d'œuf. L'ovalbumine est une protéine

de blanc d'œuf qui représente pré de 54% de ses protéines totales. Elle est fortement hydrophobe, elle est très sensible aux conditions environnementales (pH, température...). (Huntington & stein, 2001).

• Effet de la concentration d'ovalbumine

La cinétique de la dénaturation thermique à une température de 70°C de l'ovalbumine pour les dilutions 1/25, 1/50, 1/75 et 1/100 est présentée par la variation des DO à 660 nm en fonction de temps présenté dans la (Figure 08).

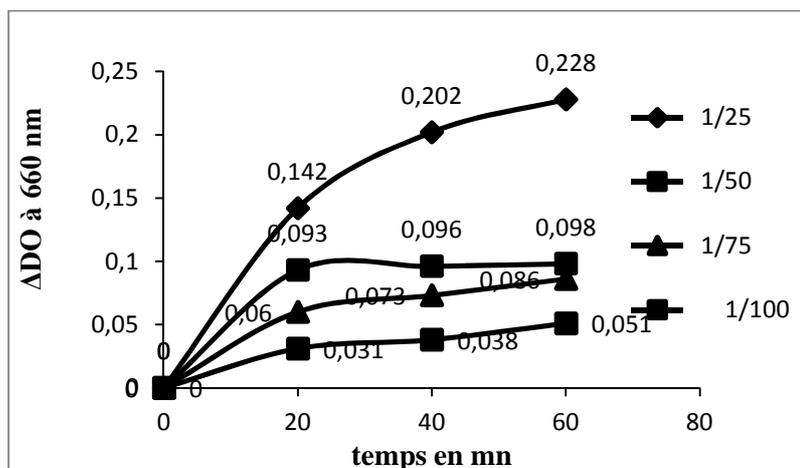


Figure 08: Variation des DO à 660 nm de l'ovalbumine incubée à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations de la protéine.

D'après les résultats de la Figure 04, quelque soit la dilution d'ovalbumine, la variation des DO augmente en fonction du temps. On remarque qu'après 60 mn, plus la dilution d'ovalbumine est grande plus les variations des DO sont faible, dont les DO des dilutions 1/25, 1/50, 1/75 et 1/100 sont 0,288, 0,9, 0,86 et 0,06 respectivement. La différence entre ces variations peut être due à la concentration d'ovalbumines contenue dans chaque dilution. On conclue que plus la concentration d'une protéine est élevée plus les variations des DO de la thermodénaturation augmentent

• Effet de l'éthanol

La cinétique de la dénaturation thermique à une température de 70°C d'ovalbumine pour les différentes concentrations d'éthanol, présentée par la variation des DO à 660nm, en fonction de temps est illustrée dans la (Figure 09).

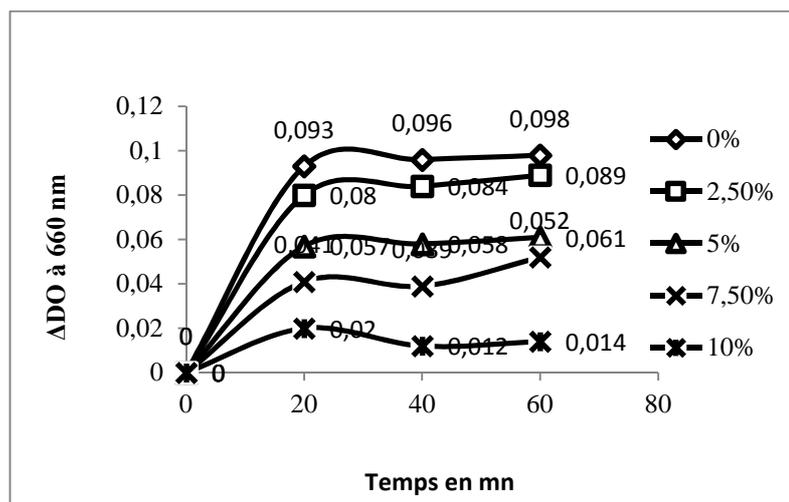


Figure 09 : Variation des DO à 660 nm de l'ovalbumine incubé à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations d'éthanol.

D'après les résultats obtenus de la **Figure 09**, on observe que quelque soit la concentration de l'éthanol la variation des DO est augmentée en fonction de temps. On remarque aussi qu'à chaque fois la concentration de l'éthanol augmente, la variation des DO diminue. Le résultat obtenus montre que l'éthanol à 7,5% et 10% présente un bon effet thermostabilisateur de d'ovalbumine dont les DO après 60 mn sont 0,52 et 0,014 respectivement. Alors que l'éthanol à 0% et 2,5% ne présente pas un effet sur la thermostabilisation de l'ovalbumine. La stabilité de cette protéine peut être due à l'effet du solvant (éthanol, eau), qui provoque la thermorésistance de l'ovalbumine.

• Effet de température

La cinétique de dénaturation d'ovalbumine est exprimée en variation des DO en fonction de temps à des températures 60°C, 70°C et 80°C est présentée dans la **Figure 10**.

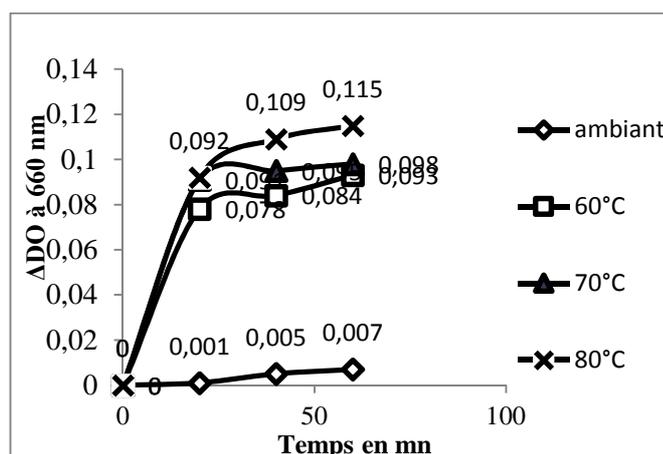


Figure 10: Variation des DO à 660nm de l'ovalbumine par une dilution 1/50 à différente température en fonction de temps.

Les DO de la dénaturation thermique d'ovalbumine après 60mn, à une température ambiante est très faibles de 0.008 par rapport à celles incubées à 60°C, 70°C et 80°C, les DO augment jusqu'à 0,12 pour la température 80°C. Pour les trois températures 60,70 et 80°C, on remarque une légère différence des DO qui est approximativement égale à 0.02.

On peut expliquer l'augmentation de la dénaturation thermique, par l'effet de la température élevée qui rompent les liaisons d'interactions faibles, tels que les liaisons hydrogène, qui conduit au dépliement de la structure générale de la protéine, et par conséquence de la perte de sa fonction (Naotoshi et al., 2001).

6. Effets inhibiteurs d'extrait de pin sur la dénaturation thermique d'ovalbumine

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire In vitro des extraits méthanoliques des graines de pin à différentes concentration, on a testé l'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine. Les taux d'inhibition pour différentes concentrations d'extrait des grains de pin sont présentés dans la (Figure 11)

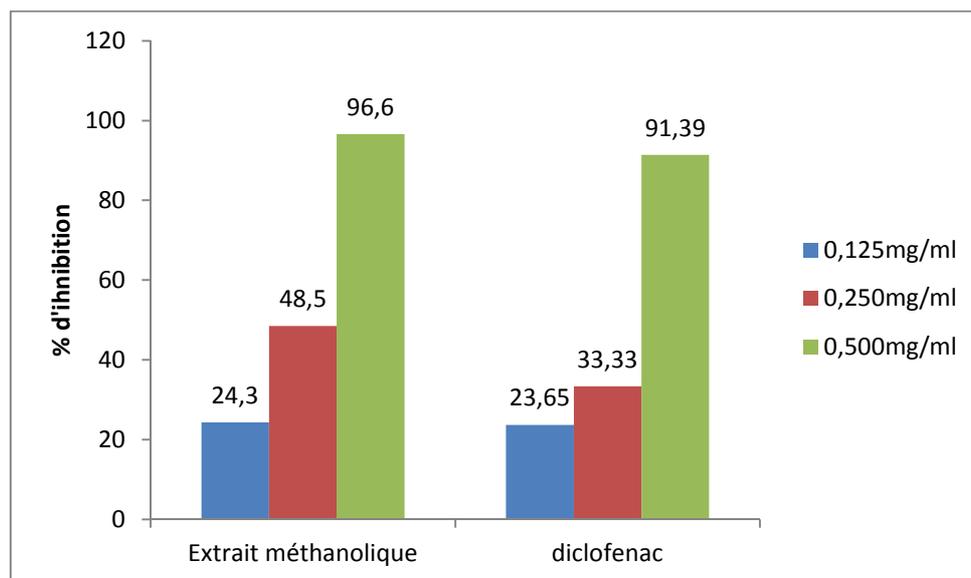


Figure 11: Taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations des extraits méthanoliques des graines de pin et Diclofenac.

Les résultats obtenus, qu'il soit par l'extrait méthanolique des graines de pin ou celui de diclofenac montrent une activité inhibitrice de 91,39% et 96,6% respectivement de la dénaturation thermique d'ovalbumine à une concentration maximale de 100 µg /ml.

La variation des taux d'inhibition pour les deux substances est augmentée proportionnellement en fonction de la concentration. Donc on constate que notre extrait a un pouvoir stabilisateur de l'ovalbumine. La stabilité des protéines par l'extrait des graines de pin met en jeu probablement des métabolites secondaires, dont l'action stabilisante résulterait de l'établissement d'interactions de types polaires et/ou hydrophobes avec les résidus d'acides aminés de surface de la protéine (Pelletier, 2009).

Conclusion

Et perspectives

Conclusion et perspectives

La règne végétal est une source inépuisable de molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique. Notre étude est consacrée à l'extraction et le dosage des composés phénoliques des graines de pin, obtenus par macération à méthanol. Le rendement en composé phénoliques a été jugé comme satisfaisant (30 mg d'extrait sec /g de poudre sèche).

L'évaluation du contenu des phénols totaux et des flavonoïdes, est effectuée par la méthode de folin-ciocalteau et celle de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) respectivement, révèlent la présence des quantités moyennement importantes en phénols totaux (11.56 mg EAG/g d'extrait sec) et (3.18 mgEQ/g d'extrait sec) des flavonoïdes.

Le potentiel anti radicalaires des extrait des graines de pin a été déterminé par la méthode anti radicalaire ABTS^{*+} et la méthode de pouvoir réducteur dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité antioxydant. Donc ces graines contiennent des molécules considérées comme des agents antioxydants potentiels.

Au cours de cette études nous avons réalisé un test anti inflammatoire par l'activité de l'extrait a stabiliser la protéine (ovalbumine) contre la dénaturation thermique, dont l'efficacité est très proche a celle de l'anti inflammatoire non stéroïdien de déclofénac (91, 31%) pour le déclofénac et (96.6%) pour l'extrait métnanolique des graines de pin.

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs, connues par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude antioxydant et anti-inflammatoire nous permet de conclure que les graines de pin sont de bonne source en antioxydants.

Notre pays possède une biodiversité immense de plantes médicinales qui se caractérisent par un réservoir assez important de métabolites avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demande :

- D'être plus exploitées par les chercheurs et faire des études biochimique sur des plantes notamment le genre *pinus*
- De déterminer des nouvelles substances naturelles pourront répondre aux différents problèmes de santé et d'être une alternative des médicaments synthétiques.
- De développer des médicaments anti radicalaires à base de plantes doués d'une activité antioxydant et anti inflammatoire.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- Adrach verma, M., Ajay Kumar, P., Kavitha, D., Aurag, K.B. (2011).** Antidenaturation and antioxidant activity of Annon cherimola in vitro. International Journal of Pharma and Bio Science, 2 (2): 1-6.
- Anderson, J.N. (2013).** Modern Bio Series. West Lafayette, Indiana, p: 39.
- Barnes Peter, J .1998.** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. Clinical Science, 94, 557-572.
- Barton, G. 2008.** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. J Clin Invest, 118: 413-420.
- Bernard, P. (2013).** Le pin d'alep en France. Edition Quae.
- Cavaillon, J. (1993).** Cytokines et inflammation. Veterinary Research. BioMed Central, 24 (4), pp.368-369.
- Charles N., Peter A., Derek W. (2010).** Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press, 2-3.
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. (2007).** Nigella Sativa L. Chemical composition and physicochemical characteristics of lipids fraction. Food chemistry. 101,p.673-681.
- Christelle, K. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition clinique et métabolisme 20 :165–177.
- Djeridane, A., Yousf, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006).** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. 97, p. 645.
- 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.
- Gausсен H., Leroy J.F., Ozenda P. (1982).** Précis de botanique : Végétaux superieurs. Ed. Masson. Paris. P55. ISBN: 2-225-65483-2.

Références bibliographiques

Ghédira, K & Goetz, P. (2011). *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) : pin sylvestre.

Goudable, J & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol* ; 11:115-120.

Hanana, M. Amri, I., Jamoussi, M., Hamrouni, L. (2014). Activités biologiques des huiles essentielles de pins. *Volum4(3). Journal of new science.*

Huntington, J & Stein, P. (2001). Structure and properties of ovalbumin. *Journal of chromatography B*, 756 :189-198.

Jacques-Paul, B., Jean-Claude, M., Georges, B. (1988). Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés. Laboratoire de biochimie, UA Cnrs 610, faculté de médecine, 51, rue Cognacq-Jay, 51095 Reims, France. *médecine/sciences*, 19 88 ; 5:304-310.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellog E.A., Stevens P. (2002). Relation phylogénétique entre les principaux groupes de trachiophytes à l'exclusion des angiospermes «Spermatophytes non angiospermes ». In. « Botanique système ». Ed. De Boeck. Paris. ISBN :2-7445-0123-9.152.

Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Crestil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., Montero, J.I. (2014). Antiangiogénic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fraction of *Pinus halepensis* Mill. Seeds. *Industrial crops and products*. 54,6-12.

Karagolez, A., Erdag, B., Calmazemek, Y. (2008). Antioxydant Activity and Proline Content of Leaf from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111: 400-407.

Karthik, K., Bharath, R., Venu, P., Sunil, K., Ranjith singh, B. (1992). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium Parum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*. ISSN: 2321-5674(Print) ISSN: 2320 – 3471(Online).

Références bibliographiques

- Kyung-Joo, C., Chang-Hyu, Y., Lester, P., An-Sik, C. (2001).** Inhibition Mechanisms of Bioflavonoids Extracted from the Bark of *Pinus maritima* on the Expression of Proinflammatory Cytokines
- Krzesinski, J., Rzesinski, P., PIRONT, P. (2002).** Décompensation cardiaque, fonction rénale et anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Rev Med Liege*; 57 : 9 : 582-586.
- Kumar, V., Abul K., Nelson, F., Richard M. (2007).** Robbins Basic Pathology, 8th Edition, 20-60.
- 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.
- Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K-V., Biro, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. Jozsef Fodor National Center of public Health, National Institute of Food-Hygiene and Nutrition, Budapest, Hungary. 47,109-125.
- Naotochi, M., Hidekazu, T., Takeshi, M. (2001).** Some structural properties of ovalbumin heated at 80°C in the dry state. *Food Research International* 34, 229-235.
- Neacsu, M., Eklund, P., Sjöholm, R., Pietarinen, R., Ahotupa, M., Holmbom B., Willfor, S. (2006).** Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen.
- Nergiz, C., Donmez, I. (2004).** Chemical composition and nutritive value of *pinus pinea* L. seed. *Food Chemistry*. 86, p.365.
- Orban, J. (2011).** Oxygène, stress oxydant. *Désordres métaboliques et réanimation*. P 428-435.
- PASQUIER, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. N ° 276.p 87-92.
- Pelletier, C. (2009).** Mesure de turbidité. *Technique de l'Ingénieur Mesure et Contrôle*, 2(2355) : 1-19

Références bibliographiques

- Ryan, I. (2013).** Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *Int J Sci*
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, 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 *olea edulis* leaves using response surface methodology. *Séparation and purification Technology*. 55, 381-387.
- Sbay, H & Hjib S. (2012).** Le pin pignon : une espèce de choix dans le contexte des changements climatiques. Editeur : centre de recherche forestière
- Stéphanie, D., Xavier, V., Philippe, C., Marion, W., Jean-Michel, M. (2009).** Comparative Study of Antioxidant Properties and Total phenolic Content of 30 plant Extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1786-1774.
- 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.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Ghariabeh, M., El-Elimt, T. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*. 104, p. 1372.
- 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 arbiquina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of science of food and agriculture*. 82, p.892.
- Wiell, B & Batteux, F. (2003).** "Immunologie et réactions inflammatoires". 1ère édition Bruxelles, p : 12-24

Annexes

Annexe 01 :

Réactif et solution pour le dosage des polyphénols et flavonoïdes

- Folin-ciocalteu à 10% : 10ml du réactif de folin-ciocalteu dans une fiole gaugé de 100ml et compléter au traits de gauge avec l'eau distillée.
- Na₂CO₃ à 6% : 6g d'AlCl₃ dans 100ml d'eau distillée.

Courbes d'étalonnages

- ✓ Courbe d'étalonnages pour le dosages des polyphénols totaux (référence l'acide gallique).

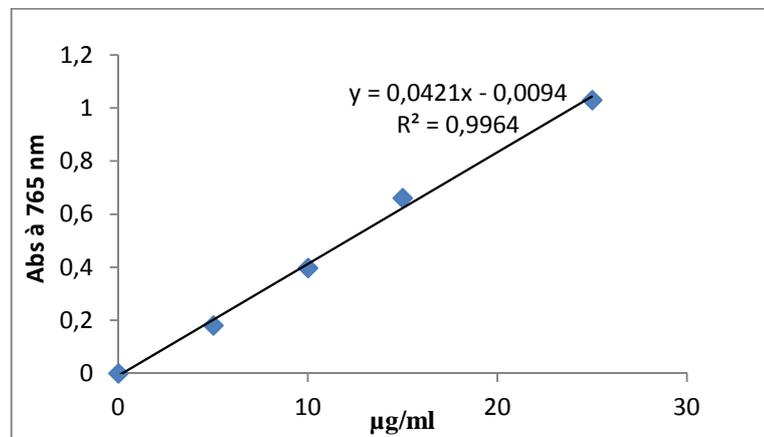


Figure 01 : Variation de l'absorbance à 765 nm en fonction de la concentration de l'acide gallique .

- ✓ Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes (référence quercétine)

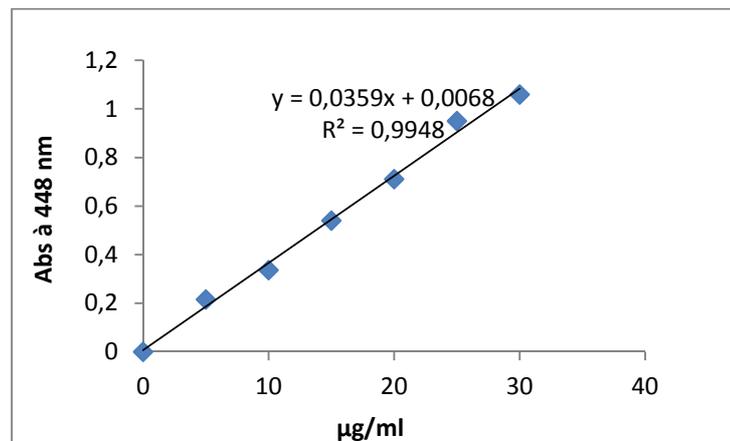


Figure 02 : Variation de l'absorbance à 448nm en fonction de la concentration de la quercétine

Résumé : le pin est l'une des plantes médicinales traditionnelles qui possède de nombreuses propriétés biologiques, qui sont attribuées à sa richesse en composés phénoliques. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'extrait méthanolique des graines de pin et son effet anti inflammatoire, le test anti thermo-dénaturation d'ovalbumine, ainsi qu'à son effet antioxydant, en utilisant le test de pouvoir réducteur et l'effet anti radicalaire ABTS. Les résultats de dosage montrent la richesse d'extrait en phénols totaux (11,56mg/g), suivi des flavonoïdes (3,18mg/g). Une concentration maximale d'extrait (1mg/ml), présente un pouvoir réducteur d'une absorbance de 0.6 nm et inhibe 22% de radicale ABTS. La concentration 400µg/ml d'extrait possède un taux de 96% d'inhibition de la dénaturation thermique d'ovalbumine.

Mots clés: Le pin, polyphénols totaux, flavonoïdes, activité anti inflammatoire, activité antioxydant.

Abstract: the pine is one of the traditional medicinal plants which have many biological properties, which are allotted to its wealth of phenolic compounds. Within the framework of this works, we were interested in the extract methanolic of pine seeds and its anti inflammatory effect; the test anti thermo denaturation of ovalbumin, thus its antioxydant effect, by using the test of reducing power and effect scavenging activity of ABTS. The results of proportioning show the richness of extract out of total phenols (11,56mg/g), followed flavonoïdes (3,18mg/g). A maximum concentration of extract (1mg/ml), presents a reduction of an absorptance of 0.6 nm and inhibits 22% of radical ABTS. The concentration 400µg/ml of extract has a rate of 96% of inhibition of the thermal denaturation of ovalbumin.

Key words: The pine, phenols total, flavinoïdes, inflammatory anti activity, antioxydant activity.