

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université De 8 mai 1945 –Guelma-
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de **Master**
en **Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire**

Thème

**Effet de la digestion gastro-intestinale *in vitro* sur l'activité
antioxydante des composés phénoliques des graines de pin
d'Alep (*Pinus halepensis* Mill)**

Présenté par :

M^{me} ADJINE Manel

M^{lle} BENMARCE Racha

Membres de jury :

Président : M^r CHEMMAM M.

Promotrice : M^{me} YDJEDD S.

Examinatrice : M^{me} BENOSMANE S.

Remerciements

Je remercie tout d'abord le **Bon Dieu**, le tout puissant et miséricordieux, qui m'a procuré santé, patience, savoir et courage pour mener à terme ce travail.

Mes remerciements les plus vifs vont à Mme Ydjedd siham qui m'a encadré de la meilleure façon qu'il soit.

Toute ma gratitude va à Mr Chaalal Makhoulf qui m'a été d'une très grande aide en m'accompagnant et en me guidant tout au long de cette année.

Je remercie ma très chère amie Rezkallah imen et son époux Dr Atoussi sadek qui m'ont été d'une très grande aide et soutien.

J'adresse aussi mes sincères remerciements aux honorables membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail. Vos visions, remarques et suggestions seront certainement très objectives et bénéfiques.

Et à toute personne qui m'a aidé de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail, j'adresse mes remerciements les plus sincères.

Sincèrement Manel .

A l'issue du cycle de ma formation je tiens à remercier Dieu le tout puissant.

Mes remerciements les plus sincères vont à :

- Mme Ydjedd et Mr Chaalal pour les conseils précieux et leur suivi qu'ils m'ont prodigués durant tout mon travail ;
- Mes vifs remerciements vont aux membres du jury pour avoir accepté de juger mon modeste travail ;
- En fin, à toute personne qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire, qu'elle soit sincèrement remerciée ainsi tous les professeurs qui ont participé à ma formation.

Sincèrement Racha.

Dédicaces

Moi, Manel, je dédie ce travail à :

Mes parents qui m'ont tant donné tout au long de ma vie.

A mes frères adorés Yacine, Rédha et Nadjib.

A mon époux Badri pour son soutien.

A toute ma famille, belle famille, amis et collègues.

Je dédie ce travail à ma maman qui m'a soutenu et encouragé durant des années d'étude, qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mon père que j'ai perdu trop tôt.

A mon seul frère que j'aime tellement.

A mon oncle Elhadi Bouras, le frère de maman, qui m'a toujours fourni assistance et soutien et à comblé nombre de mes désirs depuis ma naissance.

A mon oncle Ammar Bouras, qui me conseil toujours et me guide vers le meilleur.

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour.

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès

A tous ceux que j'aime et à vous chers lecteurs.

Racha

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le pin d'Alep (<i>Pinus halepensis</i> MILL)	3
I.1. Description botanique	3
I.2. Taxonomie	4
I.3. Distribution	4
I.4. Composition chimique	5
I.5. Intérêts et utilisations de <i>Pinus halepensis</i>	5
II. Structures et classification des composés phénoliques.....	5
II.1. Définitions	5
II.2. Classification des composés phénoliques.....	6
III. Digestion gastro-intestinale et biodisponibilité des composés phénoliques	6
III.1. Objectif des simulations de la digestion <i>in vitro</i>	7
III.2. Types de simulations de la digestion <i>in vitro</i>	7
III.2.1. Modèles intestinaux.....	8
III.2.2. Modèles de fermentation colique (Digestion dans le colon).....	8
III.3. Métabolisme et biodisponibilité des composés phénoliques.....	8
IV. Composés phénoliques et santé.....	11

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	13
--------------------------	----

2. Extraction des composés phénoliques	13
3. Digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i>	15
4. Dosage des composés phénoliques	18
4.1. Dosage des composés phénoliques totaux	18
4.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FT).....	18
4.3 Dosage des proanthocyanidines	19
5. Activité antioxydante	19
5.1 Pouvoir réducteur de fer	19
5.2 Activité antiradicalaire DPPH.....	20
5.3 Test phosphomolybdate.....	20
6. Analyse statistique.....	20

Résultats et discussion

1. Extraction des composés phénoliques	21
II. Dosage des composés phénoliques	21
II.1. Teneur en composés phénoliques totaux	21
II.2. Teneur en flavonoïdes totaux	23
Conclusion.....	Erreur ! Signet non défini. 24
Références bibliographiques	25
Annexe	34

Liste des abréviations

LDL ; low density lipoprotein (protéines de faible densité)

PH : potentiel hydrogène

DGIIV : digestion gastro-intestinale *in vitro*

LS : liquide salivaire

LG : liquide gastrique

LI : liquide intestinal

SM : solution mère

CPT : composé phénolique totaux

EAG : équivalent acide gallique

EQ : équivalent quercétine

FT : flavonoïdes totaux

UV : ultras violet

Liste des figures

Figure 1. Photographies de l'arbre de <i>Pinus halepensis</i> Mill, des cônes, des aiguilles et des graines	3
Figure 2. Organisation de l'appareil digestif de l'Homme	7
Figure 3. Bioaccessibilité et biodisponibilité des composés bioactifs	9
Figure 4. Schéma général de biodisponibilité des polyphénols	11
Figure 5. Effets biologiques des polyphénols	12
Figure 6. Préparation de la poudre des graines du pin d'Alep.	14
Figure 7. Préparation de l'extrait acétonique.	14
Figure 8. Préparation de l'extrait phénolique brut.	15
Figure 9. Diagramme de la digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i>	17
Figure 10. Teneur en composés phénoliques totaux de la poudre des graines entières et de l'extrait brut avant et après différentes phases de digestion <i>in vitro</i>	21
Figure 11. Teneur en flavonoïdes totaux de la poudre des graines entières et de l'extrait brut avant et après les différentes phases de digestion <i>in vitro</i>	23

Liste des tableaux

Tableau I. Taxonomie de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	4
Tableau II. Classes de composés phénoliques	6
Tableau III. Composition de trois phases de la digestion (orale, gastrique et intestinale).....	16

Introduction

Introduction

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique s'est très accentuée ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents thérapeutiques contre les maladies mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants (**Belyagoubi, 2011**).

Parmi ces plantes, on trouve le pin d'Alep du genre *Pinus* qui produit des graines comestibles et très nutritives. le genre *Pinus* comprend environ 800 espèces dans le monde, principalement concentrées dans l'hémisphère nord (**Maestrea et al., 2003**).

Par ailleurs les composés phénoliques sont les antioxydants les plus répandus dans notre alimentation dont nous ingérons chaque jour environ 1 g soit 10 fois plus que la vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes (**Scalbert et Williamson, 2000 ; Manach et al., 2004**).

En outre, ces molécules jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et des légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effets antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers) (**Boubekri, 2014**). En revanche et selon **Lu et al., (2016)**, la consommation des composés phénoliques limite ces avantages en raison de leur faible biodisponibilité, faible solubilité et de leur faible absorption .

Cependant la biodisponibilité est un aspect important lorsque l'on étudie le rôle des polyphénols dans la santé humaine (**Kamiloglu, 2016**). Les polyphénols sont ingérés sous forme de mélange complexes immergés dans une matrice alimentaire, qui subissent un processus de digestion, donc il est important de déterminer comment ce processus de digestion affecte les polyphénols et leur stabilité car cela, à son tour, affecte leur bioaccessibilité à l'absorption ainsi que leurs effets bénéfiques possibles sur la santé (**Kamiloglu, 2016**).

Au cours de cette dernière décennie, de nombreuses études ont été menées sur la stabilité et la biodisponibilité des composés phénoliques, contenus dans les aliments, durant le processus de digestion, et qui montrent que ces propriétés variaient beaucoup d'un composé phénolique à l'autre, en fonction de leur libération et de la matrice alimentaire les véhiculant, affectant ainsi leurs bienfaits sur la santé (**Frontela-Saseta et al., 2011 ; Correa-Betanzo et al., 2014 ; Gullon et al., 2015**)

Il existe des études sur l'effet de la digestion *in vitro* sur les polyphénols alimentaires dans des fruits tels que les pommes, les fraises, la figue de barbarie (**Bouayed et al., 2011 ; Granese et al., 2014 ; Chaalal et al.,2018**) ainsi que les extraits phénoliques de la pulpe de caroube (**Ydjedd et al.,2017**).

L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'effet de la digestion gastro-intestinale *in vitro* sur l'activité antioxydante des composés phénoliques de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill).

Afin d'améliorer la lisibilité du manuscrit, ce dernier est structuré en trois grandes parties : la première consiste en une synthèse bibliographique qui s'intéresse au pin d'Alep, les composés phénoliques et à la digestion, la deuxième partie illustre le matériel et les méthodes mis en œuvre pour l'extraction, la digestion *in vitro*, les dosages et les activités effectués. Tandis que la troisième partie porte sur les résultats obtenus et leur discussion.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le pin d'Alep (*Pinus halepensis* MILL)

I.1. Description botanique

C'est une espèce appartenant à la famille des pineaceae, ce sont des arbres conifères de 2 à 100 m de hauteur. Le Pin d'Alep a généralement un tronc tortueux, irrégulier et branchu. L'écorce des jeunes sujets est lisse et d'un gris argenté ; chez les adultes, elle forme un rhytidome plus ou moins gerçuré en écailles minces, larges et aplaties et de couleur rougeâtre. Les feuilles en aiguilles très fines, < 1 mm, molles, très finement serrulées sur les bords, 5 à 10 cm de long ; réunies par deux, rarement par trois dans une gaine ; groupées en pinceaux à l'extrémité des rameaux ; couleur verte jaunâtre. Les cônes sont ligneux à écailles dures, pédonculés, isolés ou par paires, ovoïdes-coniques à écusson proéminent et toujours longuement persistants, ils mûrissent au cours de la deuxième année et laissent le plus souvent échapper leurs graines au cours de la troisième année. Le cône doit avoir subi de forte chaleur qui détruit les joints de résine entre les écailles pour pouvoir s'ouvrir. Ce dernier renferme des graines mates de 7 mm de taille, à aile allongée et presque droite des deux côtés (figure 1) (Nahal, 1962 ; Maestrea et al., 2003) .



Figure 1. Photographies de l'arbre de *Pinus halepensis* Mill, des cônes, des aiguilles et des graines (Maestrea et al., 2003).

I.2. Taxonomie

La systématique du pin d'Alep se résume comme suit :

Tableau I. Taxonomie de *Pinus halepensis* Mill (**Farjon , 1996**) .

Taxonomie	Description
Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphyta
Sous-embranchement	Gymnosperme
Classe	Pinapsida
Ordre	Abietale
Famille	Pinaceae (abietaceae)
Sous-famille	Pinoideae
Genre	Pinus
Sous-genre	Eupinus
Espèce	<i>Pinus halepensis</i> Mill

I.3. Distribution

Mondialement parlant, l'aire de répartition du pin d'Alep est limitée au bassin méditerranéen dont il occupe plus de 3,5 millions d'hectares (**Quezel, 1986**) et domine les formations forestières dans les régions semi-arides et arides, il envahit également certaines zones de l'hémisphère sud. Cette espèce est surtout cantonnée dans les pays du Maghreb, notamment en Algérie et Tunisie (**Nahal, 1962 ; Maestrea et al., 2003**), et en Espagne où elle trouve son optimum de croissance et développement (**Parde, 1957**).

En Algérie et d'après **Zenzen (2016)**, le pin d'Alep est fréquent surtout sur les massifs du tell littoral et l'Atlas saharien, Il s'étend à lui seul sur près de 850.000ha, il occupe 37% de la surface effectivement boisée de l'Algérie. Selon **Boudy (1952)**, Le pin d'Alep présente de vastes peuplements en oranais (Sidi-Bel-Abbès, Saïda, Tlemcen,Tiaret) dans l'Algérois (média, Boghar, Monts des Bibans) sur l'Atlas saharien (mont de Ouled Nail) et dans le sud Constantinois (Aurès, région de Tébessa)

I.4. Composition chimique

D'après **Cheik-Rouhou et al., (2006)**, l'analyse moyenne des graines montre qu'elles se composent de 22,7 % de protéines, 43,3 % d'huile et 25,7 % d'hydrates de carbone totaux (ces valeurs sont exprimées en pourcentage du poids sec). Concernant les minéraux, il y a une dominance de potassium, magnésium et calcium avec un taux atteignant ensemble les 1%. Pour les acides oléiques et linoléiques qui sont les principaux acides gras insaturés on note un taux de 27,3% et de 48,8% ; respectivement, alors que le principal acide gras saturé est l'acide palmitique (8,75%).

Quant aux polyphénols totaux et flavonoïdes, ils y sont présents aux pourcentages de 3,71 % et 0,80 % respectivement.

I.5. Intérêts et utilisations de *Pinus halepensis*

Le genre *Pinus* est très connu pour ses propriétés en médecine traditionnelle algérienne comme : Antiseptique puissant à action dynamisante ; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires et les calculs biliaires. C'est aussi un rubéfiant et balsamique efficace dans les affections pulmonaires : la grippe, la sinusite, les rhumatismes. Les sirops, les infusions, les tisanes et les jus de *Pinus halepensis* Mill sont connus par leur effet balsamique pour vaincre les affections catarrhales du système respiratoire. On utilise les bourgeons de cette espèce en parfumerie et en savonnerie. Mais, les principales utilisations de pin sont liées à la production de bois comme bois d'industrie ainsi que pour la charpente ou la menuiserie. Il est aussi utilisé pour la protection des sols et dans le domaine cosmétique expliqué par sa richesse en acide gras, vitamine E, polyphénols et antioxydants naturels (**Boulaacheb, 2009**).

II. Structures et classification des composés phénoliques

II.1. Définitions

Les composés phénoliques, ou polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (**Gee et Johnson, 2001**). Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une des caractéristiques d'une sous-classe des flavonoïdes (**El gharras, 2009**).

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des

composés phénoliques ; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (Dacosta,2003)

II.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être classés selon la complexité, le degré et les liaisons possibles du squelette de base avec d'autres molécules (Tableau II) (Dacosta, 2003).

Tableau II. Classes de composés phénoliques (Dacosta, 2003).

Structure	Classe
C ₆	Phénols simple
C ₆ -C ₁	Acides phénoliques et composés dérivés
C ₆ -C ₂	Acétophénone et acides phénylacétiques
C ₆ -C ₃	Acides cinnamiques, coumarines, isocoumarines, chromones
C ₁₅	Flavanols, flavonones, anthocyanines et anthocyanidines
C ₃₀	Biflavonyles
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzophénones, xanthonnes et stilbéne
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Quinones
C ₁₈	Bétacyanines
Lignanes ,neolignanes	Dimères ou oligomères
Lignine	Polymères
Tanins	Condensé et hydrolysable

III. Digestion gastro-intestinale et biodisponibilité des composés phénoliques

L'appareil digestif est l'ensemble des organes qui assurent la transformation et l'assimilation des aliments, source unique de l'énergie et de matières indispensables au fonctionnement du corps, il comprend une série d'organes creux formant le tube digestif ainsi qu'un ensemble de glandes annexes (figure 2) (kohler, 2011).

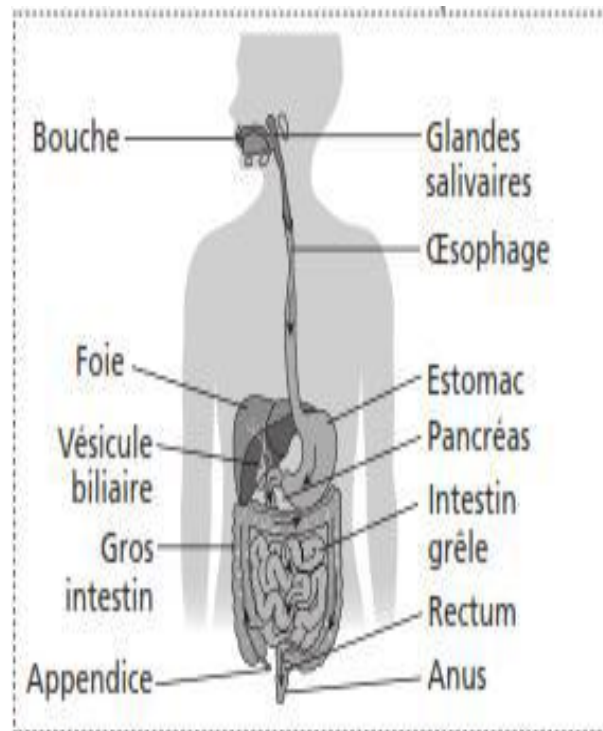


Figure 2. Organisation de l'appareil digestif de l'Homme (Kohler, 2011)

III.1. Objectif des simulations de la digestion *in vitro*

Les modèles de simulation *in vitro* du processus de digestion imitent les conditions physiologiques et les réactions luminales qui se produisent dans la bouche, l'estomac et l'intestin grêle, quel que soit le métabolisme. L'objectif de ces simulations est de caractériser les changements qui se produisent dans les composants alimentaires pendant le processus de digestion dans des conditions physiologiques, en adaptant la température, le pH, les concentrations enzymatiques et, en particulier dans les modèles de fermentation colique (le microbiote) (Aura, 2005).

III.2. Types de simulations de la digestion *in vitro*

En général, il existe deux types de simulations de digestion *in vitro* : les modèles intestinaux *in vitro* et les modèles de fermentation colique. Pour les premiers ils sont couramment utilisés pour évaluer la digestibilité des composants alimentaires et détecter les changements dans la fraction non digestible, quant aux seconds, ils comprennent un inoculum de microbiote colique, utilisé pour évaluer le métabolisme colique, habituellement en utilisant la partie non digestible obtenue après la simulation intestinale *in vitro* (Aura, 2005).

III.2.1. Modèles intestinaux

En général, toutes les simulations de digestion *in vitro* sont effectuées à 37 °C et simulent la durée de digestion chez les humains, avec de légères modifications, selon la nature de l'échantillon testé (Laurent *et al.*, 2007 ; Ortega *et al.*, 2011).

Pour évaluer la digestibilité, les modèles de digestion *in vitro* sont couramment utilisés, les chercheurs ont opté pour des changements structurels et la libération de composants alimentaires dans des conditions gastro-intestinales car c'est un moyen peu coûteux et plus rapide par rapport aux études sur les animaux et les humains. Ces modèles de digestions *in vitro* présentent des différences les uns des autres principalement dans les étapes de digestion représentées dans le modèle (bouche, estomac, petit et gros intestin), la composition des fluides biologiques (par exemple, les sels, les enzymes et les tampons) et les flux de fluide utilisés dans chaque étape du processus de digestion (Hur *et al.*, 2011)

III.2.2. Modèles de fermentation colique (Digestion dans le colon)

Les enzymes de la microflore colique agissent sur les composés phénoliques non métabolisés, composés phénoliques liés à la matrice alimentaire, et les métabolites qui atteignent le côlon. Les nouveaux métabolites coliques peuvent exercer une fonction spécifique dans le côlon lui-même et cela avant leur excrétion (Unno *et al.*, 2003) ou peuvent être absorbés et renvoyés dans la circulation sanguine, pour atteindre les centres d'action du métabolisme (Lampe, 2003). Selon Minekus *et al.*, (1999) et Cinquin *et al.*, (2006) plusieurs modèles de fermentation colique ont été développés, bien que le principe de base du modèle de fermentation colique soit commun pour tous les modèles. Il s'agit des fermenteurs simples ou multiples inoculés avec un microbiote fécal fonctionnant sous température et pH physiologiques, dans des conditions anaérobies.

III .3 . Métabolisme et biodisponibilité des composés phénoliques

La biodisponibilité peut être définie comme la quantité ou le pourcentage d'un nutriment ingéré qui est absorbé et ainsi disponible pour le corps à des fins métaboliques (Richelle *et al.*, 2009) . La bioaccessibilité est un concept lié à la biodisponibilité dans le contexte de la biodégradation. cette dernière est définie comme étant le pourcentage de nutriments libérés des aliments qui est potentiellement disponible pour l'absorption intestinale (figure 3) (Guerra *et al.*, 2012).

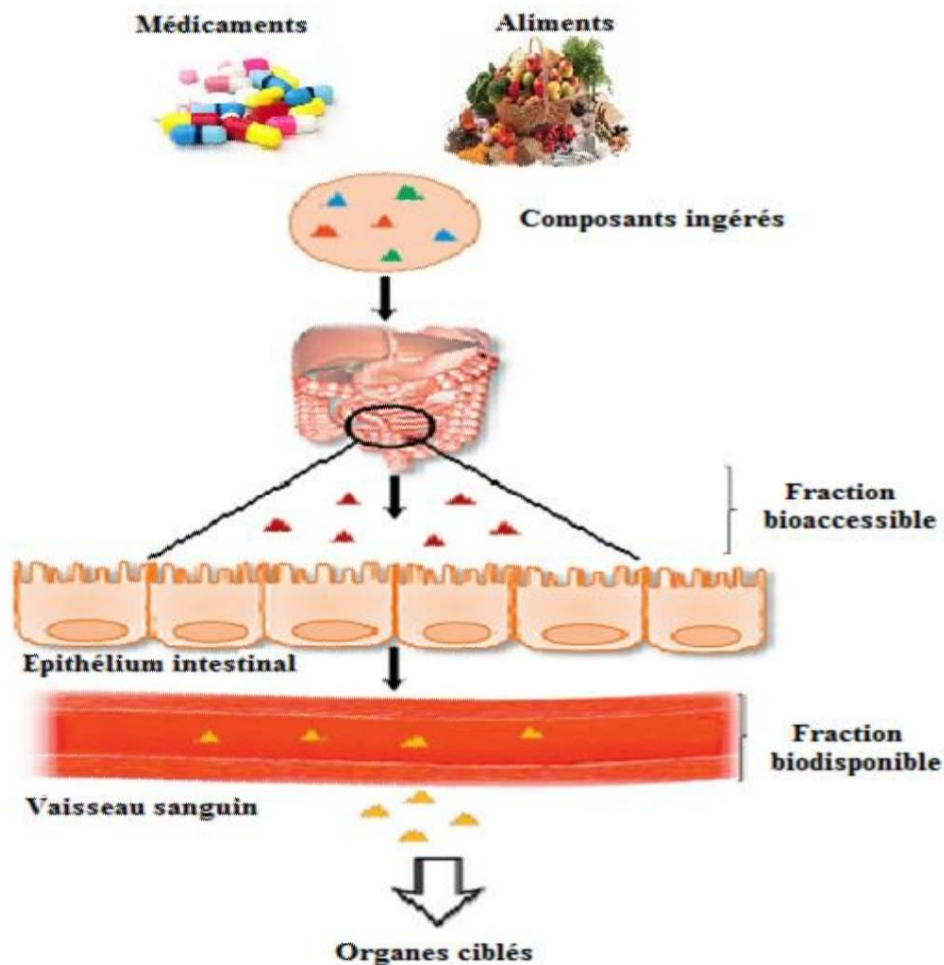


Figure 3. Bioaccessibilité et biodisponibilité des composés bioactifs (Guerra *et al.*, 2012).

Les effets des polyphénols sur la santé sont indissociables de la notion de biodisponibilité, qui intègre un grand nombre de paramètres comme : l'absorption intestinale, l'excrétion des métabolites dans la lumière intestinale, le métabolisme par la microflore, le métabolisme intestinal et hépatique, les propriétés des métabolites circulants (structures, cinétiques d'apparition et d'élimination, liaison à la sérum albumine et autres protéines du plasma), la captation cellulaire, le métabolisme dans les tissus cibles, la sécrétion biliaire et l'excrétion urinaire (figure 4) (Spencer *et al.*, 2004 ; Manach *et al.*, 2006).

- **Au sein de l'estomac**

Seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamiques sous forme liée tels que l'acide chlorogénique peuvent être absorbés directement à partir de l'estomac (Manach *et al.*, 2005).

- **Au niveau de l'intestin grêle**

Les aglycones de polyphénols (ex.: les flavanols) et les O-β-D-glucosides peuvent être notablement absorbés dans le petit intestin, les premiers par diffusion passive, les seconds selon deux mécanismes: Une absorption directe des glucosides *via* le transporteur de glucose sodium-dépendant. Elle est suivie par l'hydrolyse des glucosides dans le cytosol par une β-glucosidase cytosolique. Un autre mécanisme impliquant la lactase phloridzine hydrolase, une glucosidase de la bordure en brosse de l'intestin qui catalyse l'hydrolyse extracellulaire des glucosides, a aussi été démontré. Il est suivi par l'absorption de l'aglycone ainsi libéré par diffusion passive (**Day et al., 2003**)

- **Au niveau du colon**

Les polyphénols non absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle atteignent le côlon, puis sont catabolisés par la microflore colique, ayant des activités enzymatiques diverses, avant d'être absorbés. En particulier, la rutine, un flavonol commun de l'alimentation quercétine (3-O-β-D-(L-rhamnosyl-β-1,6-D-glucoside)), doit être hydrolysée par les enzymes bactériennes avant d'être absorbée au niveau du côlon et atteint la circulation sanguine (sous forme de conjugués de quercétine) avec un retard notable par rapport aux cas des glucosides de quercétine (abondants dans l'oignon), absorbés dès le petit intestin. D'une manière générale, le catabolisme de la microflore colique peut produire des métabolites biodisponibles, en concentration de l'ordre de 1 mM, comme l'acide benzoïque, l'acide phénylacétique et l'acide phénylpropionique (**Williamson et Clifford, 2010**). En particulier, les proanthocyanidines ne sont pas biodisponibles sous leurs formes natives et l'absorption est limitée aux catabolites microbiens libérés à partir des oligomères les plus courts (**Gontier et al., 2003 ; Stoupi et al., 2010**) . De même, chez les humains, il a été montré que l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, produit par la microflore colique, représente plus de 70% des métabolites de la cyanidine 3-O-β-D-glucoside (principale anthocyane du jus d'orange sanguine) avec une concentration circulante maximale de 500 nM contre seulement 2 nM pour la forme native. La fraction de polyphénols absorbés subit une conjugaison dans les entérocytes et dans les hépatocytes. Ainsi les formes circulantes sont typiquement les glucuronides, sulfates et sulfoglucuronides. De plus, les groupements catéchol, important pour l'activité antioxydante, sont partiellement méthylés par la catéchol O-méthyltransférase dans le foie (**Vitaglione et al., 2007**).

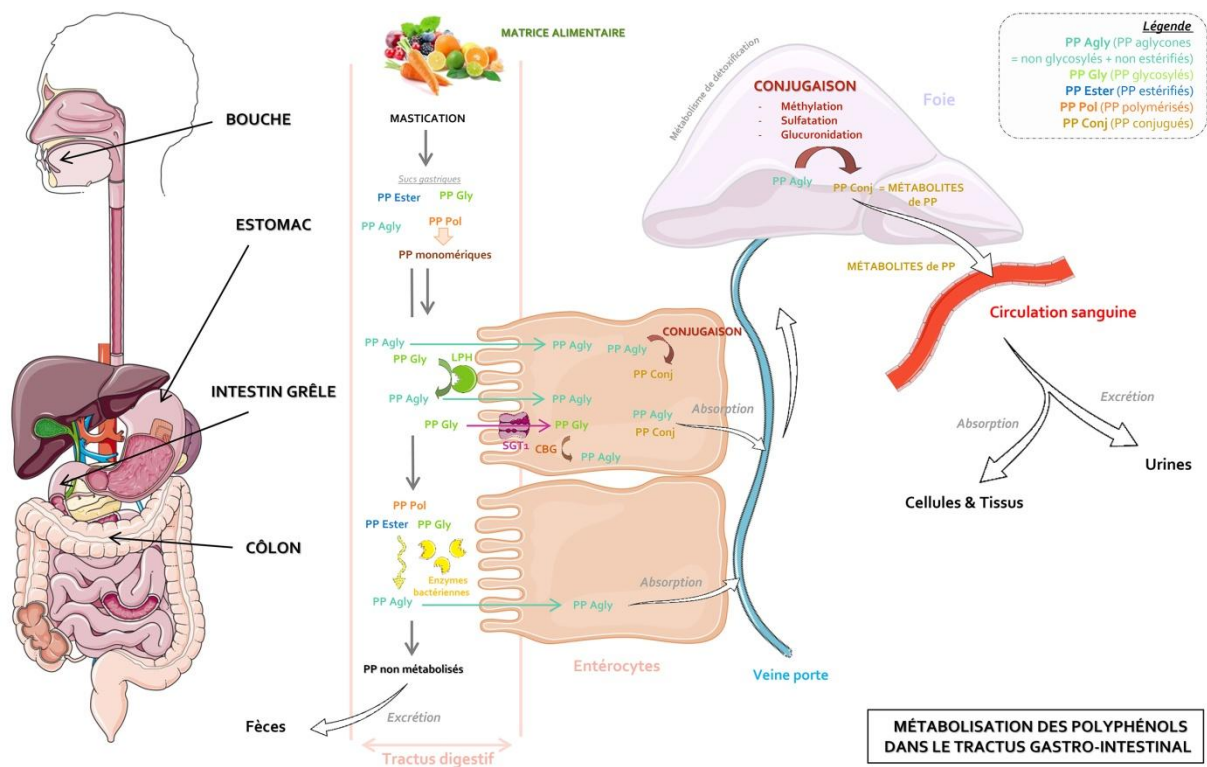


Figure 4. Schéma général de biodisponibilité des polyphénols (Manach et al., 2006)

IV. Composés phénoliques et santé

Les polyphénols ont été décrits comme étant de puissants protecteurs du système cardiovasculaire. Ils ont la capacité de moduler les processus hémostatiques, vasomoteurs, apoptotiques, prolifératifs et le remodelage vasculaire et l'angiogenèse. Ainsi, Ils possèdent également des propriétés antioxydantes, anti-agrégantes plaquettaires, anti-inflammatoires, anti-allergènes, antitumorales et antithrombotiques (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Ces antioxydants peuvent jouer un important rôle nutritionnel de prévention contre de nombreuses maladies liées à l'anxiété et au stress oxydant tels que le diabète, l'hyper-tension et le cancer (Bouayed et al., 2008). En outre, la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Figure 5) (Bahorun, 1997).

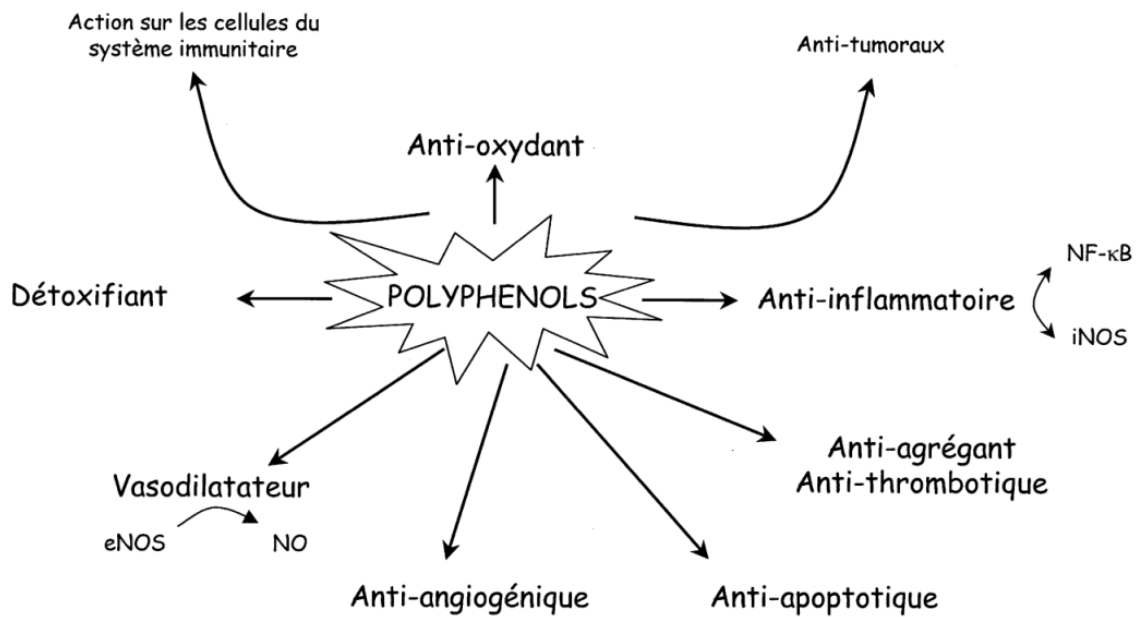


Figure 5. Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002)

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme (Macheix et al., 2005). Ils peuvent inhiber les oxydations de façon indirecte, en désactivant l'oxygène singlet, ou en chélatant les métaux de transitions (Fe^{+2} , Cu^{+2}) qui accélèrent fortement l'oxydation des lipides (Rice-Evan et Miller, 1996). Certains sont des inhibiteurs d'enzymes d'oxydation, en particulier de la lipoxygénase ou cyclo-oxygénase (Javanovic et Steenken, 1994). Leur caractère antioxydant contribue à la prévention des pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (Cook, 1998) et les cancers (Hertog, 1993). Ils peuvent aussi interagir de manière spécifique avec des récepteurs cellulaires tels que les récepteurs œstrogènes pour les isoflavones du soja, et induire aussi des effets plus spécifiques sur l'organisme (par exemple inhibition par les isoflavones des bouffées de chaleur pour la femme ménopausée) (Scalbert, 2004).

Les polyphénols sont surtout des protecteurs vasculaires améliorant la résistance et la perméabilité des vaisseaux aussi bien artériels que veineux, ils protègent les LDL vis-à-vis de l'oxydation (Leake, 1998).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude est constitué des graines entière de Pin d'Alep (*Pinus Halepensis* Mill), achetées chez un herboriste dans la rue d'Anounna, (Guelma, Algérie).

Les graines ont été bien lavées, séchées à l'air libre puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine (0,5 mm). Les poudres obtenues ont été conservées dans des bocaux en verre, fermés hermétiquement, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière, pour une utilisation ultérieure.

2. Extraction des composées phénoliques

L'acétone 70% a été choisi pour l'extraction des composés phénoliques à partir des graines de Pin d'Alep, car plusieurs études sur l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques ont montré sa capacité à extraire le maximum de ces derniers avec une activité antioxydante importante (**Chaalal et al., 2012; 2013**).

L'extraction a été effectuée en mélangeant 10g de poudre des graines de *Pinus Halepensis* avec 100 mL d'acétone 70% (3 fois) sur une plaque agitatrice à température ambiante pendant 60 min. Le mélange a été centrifugé à 4000 tr/min pendant 10 min et filtré à l'aide d'un papier filtre. Ensuite, les trois filtrats ont été assemblés, puis l'acétone a été évaporé sous pression réduite à 40 °C à l'aide d'un rota vapeur, et la phase aqueuse restante a été évaporée dans une étuve à 37 °C pendant 3 jours jusqu'à l'obtention d'un extrait concentré. Enfin, l'extrait sec obtenu a été stocké à 4 °C jusqu'à son utilisation.

Les Figures 6, 7 et 8 représentent les différentes étapes de préparation des extraits phénoliques des graines de Pin d'Alep utilisés dans la présente étude.

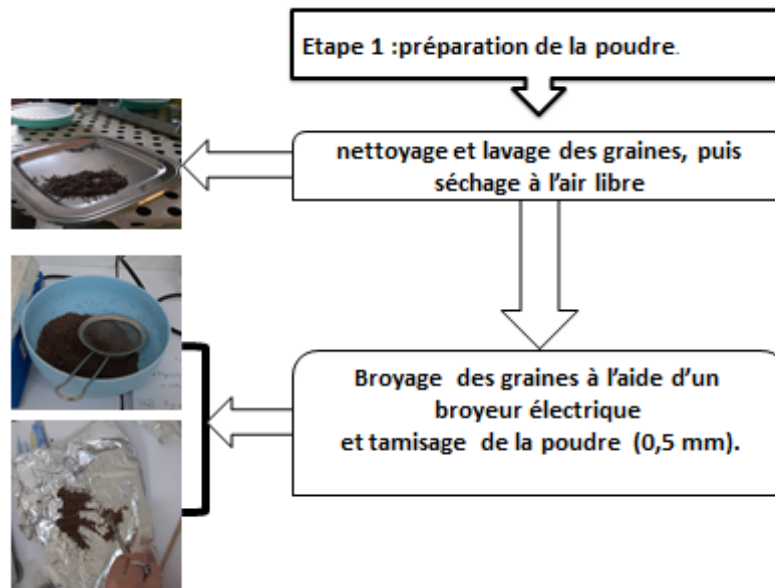


Figure 6. Préparation de la poudre des graines du pin d'Alep.

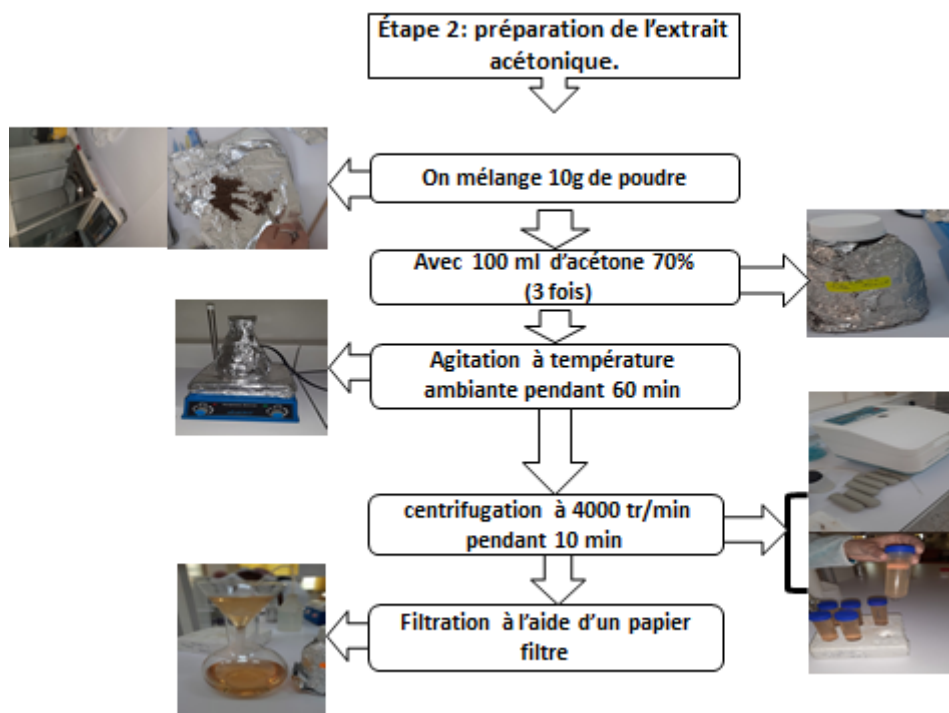


Figure 7. Préparation de l'extrait acétonique.

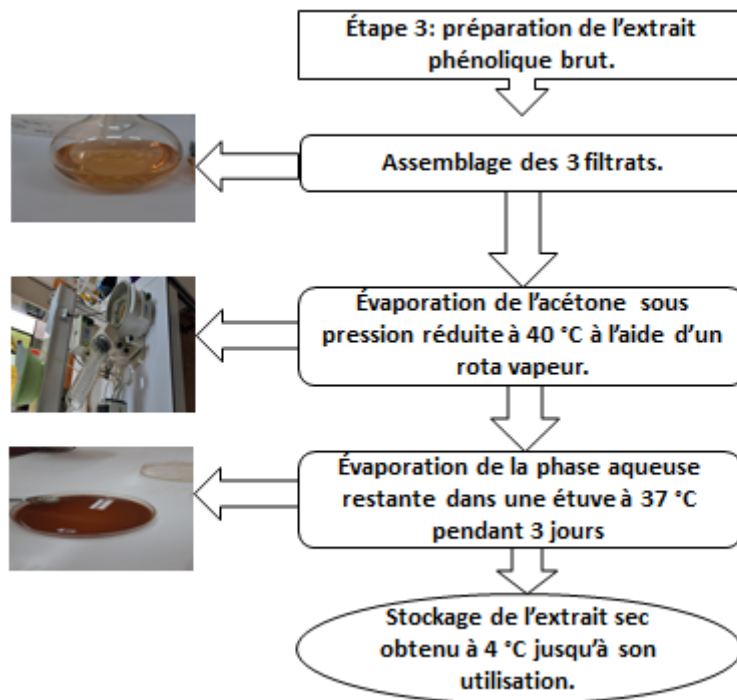


Figure 8. Préparation de l'extrait phénolique brut.

3. Digestion gastro-intestinale *in vitro*

La digestion gastro-intestinale *in vitro* (DGIIV) de la poudre des graines de Pin d'Alep et de l'extrait phénolique brut a été réalisée selon la méthode décrite par **Ydjedd et al., (2017)**. Elle consiste en une procédure en trois étapes, qui simule la digestion dans la bouche (digestion orale), l'estomac (digestion gastrique) et l'intestin grêle (la digestion duodénale) (**figure 9**).

Les liquides simulés de la digestion utilisés dans cette étude, ont été préparés avec de l'eau distillée et les produits chimiques comme c'est indiqué dans le **tableau III**.

La digestion a été commencée en ajoutant 10 mL de liquide salivaire contenant 7,5 mg de α -amylase et 25 μ L de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (0,3 M) à 1 g de l'échantillon (extrait phénolique brut/poudre des graines). Après l'ajustement du pH à 7, le mélange a été agité dans un bain marie agitateur pendant 5 minutes à 37°C.

Pour la deuxième étape, la phase gastrique (digestion gastrique), 5 mL de liquide gastrique qui contient 20 mg de pepsine et 2,5 μ L de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (0,3M) ont été ajoutés à 5 mL de la phase orale. Après l'ajustement du pH à 3 avec du HCl (6M), le mélange est incubé à 37°C dans un bain marie agitateur pendant 2 heures. Après les étapes orales et gastriques, un

volume de 5 mL d'échantillon a été prélevé pour des analyses ultérieures (dosage des composés phénoliques).

La dernière étape de la digestion est la phase intestinale, où 5 mL de liquide intestinale qui contient 37,5 mg de pancréatine et 40 mg de sels biliaires et 30 μL de $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (0,3 M) ont été ajoutés à 5 mL de la phase gastrique. Après l'ajustement du pH à 7 avec NaOH (1M), le mélange est incubé à 37 °C dans un bain marie agitateur pendant 2 heures. Les échantillons prélevés au cours de différentes phases de la digestion sont centrifugés puis filtrés avant chaque analyse.

Tableau III. Composition de trois phases de la digestion (orale, gastrique et intestinale) (Ydjedd et al., 2017).

Solutions mères (S.M.)	Quantité de S.M. ajoutée pour préparer 250 mL de Liquide salivaire (L.S)	Quantité de S.M. ajoutée pour préparer 250 mL de Liquide gastrique (L.G)	Quantité de S.M. ajoutée pour préparer 250 mL de Liquide intestinal (L.I)
KCl (0.5M)	7,55mL	3,45 mL	3,4 mL
KH₂PO₄ (0,5M)	1,85 mL	0,45 mL	0,4 mL
NaHCO₃ (1M)	3,4 mL	6,25 mL	21,25 mL
NaCl (2M)	-	5,9 mL	4,8 mL
MgCl₂(H₂O)₆(0,15M)	0,25 mL	0,2 mL	0,55 mL
NH₄(CO₃)₂ (0.5M)	0,03 mL	0,25 mL	-
HCl (6M)	0,045 mL	0,65 mL	0,7 mL

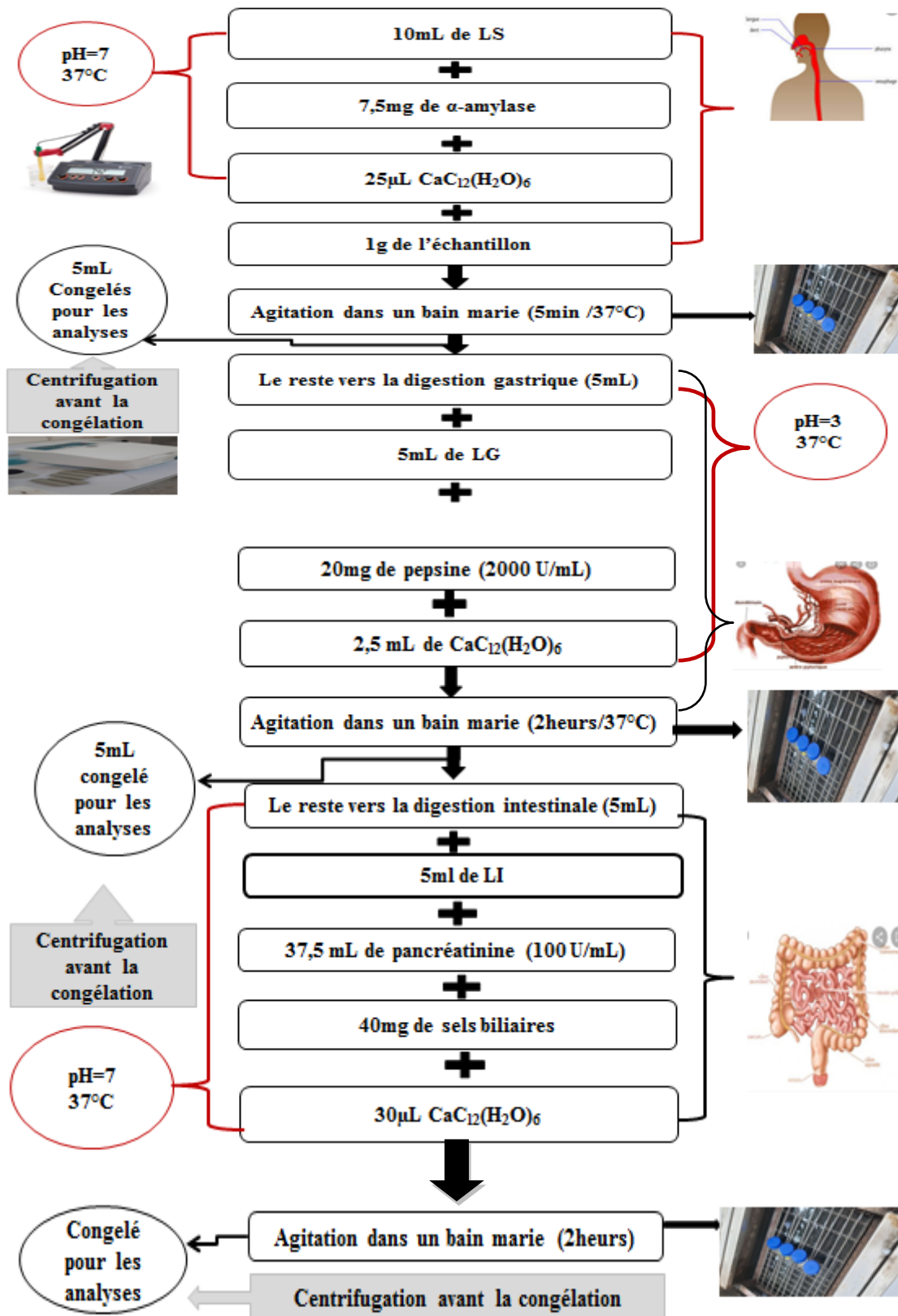


Figure 9. Diagramme de la digestion gastro-intestinale *in vitro*

4. Dosage des composés phénoliques

4.1. Dosage des composés phénoliques totaux

principe

La teneur en composés phénoliques totaux (CPT) est déterminée selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui est constitué d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Ces acides peuvent être réduits par les composés phénoliques, en milieu alcalin, en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques totaux.

Mode opératoire

Un volume de 150 μ L d'extrait est mélangé avec 750 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) et 600 μ L de carbonate de sodium (7,5%). Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 750 nm.

La teneur en composés phénoliques est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage (Figure 01, annexe) réalisée avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 g de poudre (mg EAG/100 g).

4.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FT)

Principe

Les flavonoïdes contiennent des groupements hydroxyles (OH) libres, ils forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygènes de la molécule phénolique qui agit comme donneur d'électrons (**Ribéreau Gayon et al., 1982**).

Le chlorure d'aluminium forme des complexes acides stables avec le groupement cétonique C-4 et hydroxyle C-3 ou C-5 de flavones et de flavonols et des complexes acides labiles avec les groupes d'orthodihydroxyle des noyaux A ou B des flavonoïdes. Ces complexes peuvent être dosés par spectrophotomètre UV-visible (**Chang et al., 2002**).

Mode opératoire

La teneur en flavonoïdes a été estimée selon la méthode décrite par **Quettier-Deleu et al. (2000)**. Un volume de 0,5 mL d'extrait est additionné d'un même volume de chlorure d'aluminium (2%) dissout dans le méthanol. Après incubation pendant 15 min, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 g de poudre (mg EAG/100g), en se référant à une courbe d'étalonnage (Figure 02, annexe).

4.3 Dosage des proanthocyanidines

Principe

Le principe est basé sur la méthode du butanol-HCl, c'est une méthode colorimétrique qui implique le clivage oxydatif des proanthocyanidines avec le sulfate ferreux, faisant apparaître une coloration rouge proportionnelle à la quantité des proanthocyanidines (Vermerris et Nicholson, 2006).

Mode opératoire

La teneur en tanins a été déterminée par la méthode décrite par Škerget *et al.* (2005), un volume de 2 ml du réactif butanol-HCl (77 mg FeSO₄ dissouts dans 500 ml HCl-butanol (2 :3)) est additionné à 0,5 ml d'extrait. Le mélange est incubé à 95 °C pendant 15 minutes. Les proanthocyanidines se dissocient sous l'effet de la chaleur en milieu acide donnant une coloration spécifique, l'absorbance est mesurée à 530 nm.

5. Activité antioxydante

5.1 Pouvoir réducteur de fer

Principe

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure-Fe₃⁺ en fer ferreux. La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Yildirim *et al.*, 2001).

Mode opératoire

Le pouvoir réducteur du fer a été estimé par la méthode d'Oyaizu (1986). Un volume de 0,5mL d'extrait est additionné à 0,5 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 0,5 mL de ferricyanure de potassium (1 %). Après incubation à 50 °C pendant 20 min, 0,5 mL d'acide trichloracétique (10 %) sont ajoutés au mélange suivi d'une centrifugation à 1700g pendant 15min. Une aliquote de 1 mL du surnageant est transférée dans un tube à essai est additionnée de 1mL d'eau distillée et de 0,2 mL de chlorure ferrique (0,1%). Après une incubation à l'obscurité pendant 10 min, l'absorbance est mesurée à 700 nm.

5.2 Activité antiradicalaire DPPH

✚ Principe

Le DPPH (2,2-diphényl 1-picryl-hydrazyl) est un radical stable en solution, de couleur violette. Cette méthode est basée sur le principe que le DPPH, en acceptant l'hydrogène d'une molécule antioxydante se réduit. La couleur violette devient jaune, ce changement de couleur est mesuré par spectrophotométrie et utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante (**Qusti et al., 2010; Mishra et al., 2012**).

✚ Mode opératoire

L'activité antiradicalaire DPPH a été déterminée selon la méthode de **Brand-Williams et al. (1995)**. Un volume de 100 µL d'extrait est additionné à 1000 µL de la solution de DPPH (60 µM). Le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité ; l'absorbance est mesurée à 517 nm.

5.3 Test phosphomolybdate

✚ principe

La méthode utilisant le phosphomolybdate d'ammonium est un test antioxydant important basé sur la réduction de Mo^{+6} en Mo^{+5} par un composé antioxydant. Ceci conduit à la formation d'un complexe de phosphate / Mo^{+5} , de couleur verte, avec une absorption maximale à 695 nm (**Nagavani et al., 2010**).

✚ Mode opératoire

L'activité antioxydante est aussi évaluée par la méthode au phosphomolybdate (**Prieto et al., 1999**). Elle consiste à ajouter 2 mL du réactif de phosphomolybdate (0,6 mol/L d'acide sulfurique, 28 mmol/L de phosphate de sodium et 4 mmol/L de molybdate d'ammonium) à 200 µL d'extrait. L'absorbance est mesurée à 695 nm, après incubation à 90 minutes à 95°C.

6. Analyse statistique

Les paramètres de la statistique descriptive (moyennes et écartypes) ont été calculés à l'aide du programme Microsoft Excel 2013. Le logiciel « STATISTICA 5.5 » est utilisé pour réaliser l'analyse de la variance ANOVA et le degré de signification des données est pris à la probabilité $p < 0,05$. Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois répétition (n=3).

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Les résultats sont classés par l'ordre croissant ; $a > b > c > d$; $a' > b' > c' > d'$.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des composés phyto-chimiques existants dans le matériel végétal (**Bonnaillie et al., 2012; Do et al., 2014**). Elle est régie par plusieurs paramètres dont la nature chimique de la matrice, le degré de polymérisation des composés, l'interaction de composés phénoliques avec d'autres constituants, la taille des particules de l'échantillon, le type de solvant (polarité), le temps, la température et le procédé d'extraction utilisé. En outre, la nature chimique des composés phénoliques de plantes varie de molécules simples aux substances hautement polymérisées avec des proportions variables, entre autres les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins (**Bachir Bey, 2015**).

L'objectif de l'étape d'extraction des composés phénoliques à partir de la matrice végétale est de libérer ces composés à partir des structures vacuolaires où ils se trouvent, par la rupture du tissu végétal ou par le phénomène de diffusion (**Telli et al., 2010**). Dans la présente étude l'extraction a été effectuée sur la poudre des graines moulues de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill).

II. Dosage des composés phénoliques

II.1. Teneur en composés phénoliques totaux

Les résultats de dosage des composés phénoliques totaux obtenus avant et en cours des différentes phases de la digestion gastro-intestinale *in vitro* (DGIIV) de la poudre et de l'extrait brut sont présentés dans la **figure 10**.

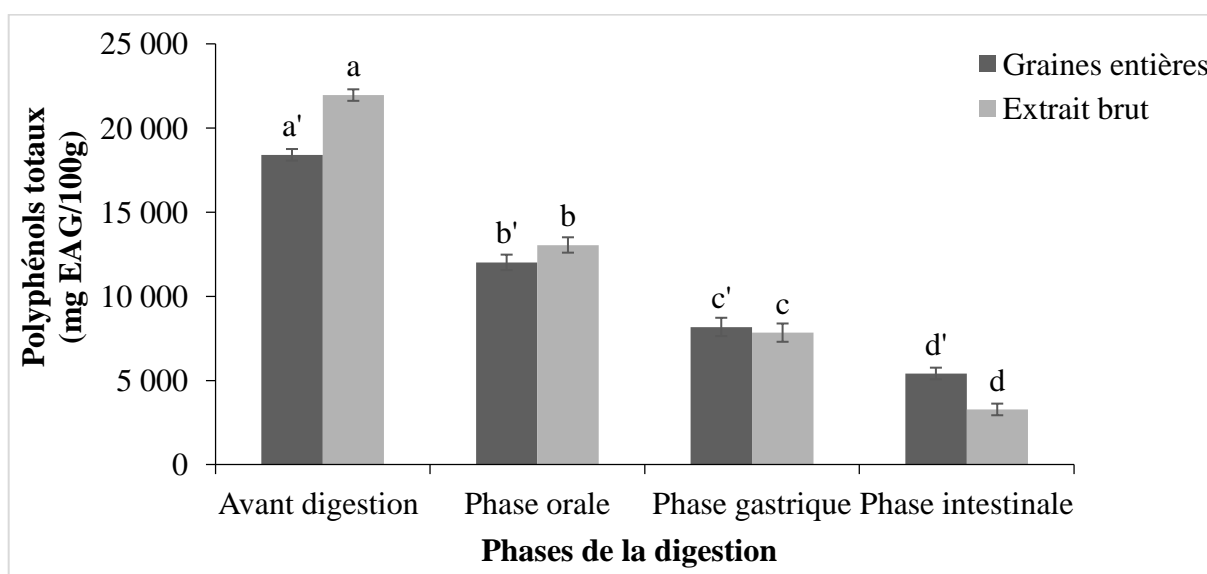


Figure 10. Teneur en composés phénoliques totaux de la poudre des graines entières et de l'extrait brut avant et après différentes phases de digestion *in vitro*.

Selon les résultats obtenus, la teneur en Composés phénoliques totaux de la poudre et de l'extrait brut avant la digestion ont présenté une très forte teneur avec les valeurs suivantes : $18402,51 \pm 0.072$ et $21949,92 \pm 0.1$ mg EAG /100g, respectivement.

La teneur en CPT de l'extrait brut est plus forte que celle des CPT de la poudre des graines, ce qui a été confirmé par l'analyse statistique qui a montré une différence significative ($p \leq 0.05$) avant la digestion entre la poudre des graines et l'extrait brut. Ce résultat pourra être expliqué par les conditions d'extraction utilisées pour l'extrait brut que pour les graines entières. En effet, la poudre des graines entières s'est dissoute dans de l'eau distillée ce qui explique la teneur moindre en CPT en comparant avec l'extrait brut qui est obtenu avec une extraction avec l'acétone 70%. La solubilité des composés phénoliques d'aliments est susceptible d'être affectée par le solvant d'extraction utilisé (**Dupas, 2005**). La teneur en CPT est généralement plus élevée lorsque ces composés sont apportés sous forme d'extrait que de fruit ou de graines entières. Selon **Dufour et al, (2004)**, la matrice limite clairement la diffusion des CPT des tissus végétaux vers le milieu gastrique.

Cependant, au cours des différentes étapes de la DGIIV, les résultats ont montré que la teneur en CPT a fortement diminué dans la phase orale pour les graines entières et pour l'extrait brut par rapport aux teneurs avant digestion : $12013,16 \pm 0,051$ mg EAG/100g pour la poudre et $13043,86 \pm 0,022$ mg EAG/ 100g pour l'extrait brut avec un pourcentage de diminution de 65.28% et 59.42% respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux obtenu par **Granese et al, (2014)**, qui ont étudié la variation de la teneur en polyphénols des fraises au cours de différentes phases de la DGIIV. Selon **Ortega et al, (2011)**, les faibles valeurs en CPT dans la phase orale (après 2 min de digestion) peuvent être expliquées par la faible solubilité de ces composés dans le fluide salivaire et la courte durée de cette phase. En outre, les transformations physico-chimiques telles que l'oxydation ou les interactions avec d'autres composés, et aussi le fait que ces composés se trouvent dans les aliments principalement sous forme liée avec différents sucres qui sont donc soumis à une digestion par les enzymes en l'occurrence (α amylase) (**Manach et al., 2004**),

La teneur en CPT continue à baisser lors de la phase gastrique ainsi que pour la phase intestinale que ce soit pour la poudre que pour l'extrait brut. En effet, la diminution en CPT durant la DGIIV peut être expliquée par l'instabilité de ces composés dans ces conditions de digestion simulées, en outre, ces molécules sont liées à des parois cellulaires végétales et sont restées massivement liées après la DGIIV. Cependant, il est bien documenté que le test de Folin-Cialteu est fortement influencé par les différences des enzymes utilisées pour la digestion et par conséquent dans les composés phénoliques au cours de la digestion *in vitro* (**Kamiloglu, 2016**).

II.2. Teneur en flavonoïdes totaux

Les résultats de dosage des flavonoïdes totaux obtenus avant et en cours des différentes phases de la digestion gastro-intestinale *in vitro* (DGIIV) de la poudre et de l'extrait brut sont présentés dans la (figure 11).

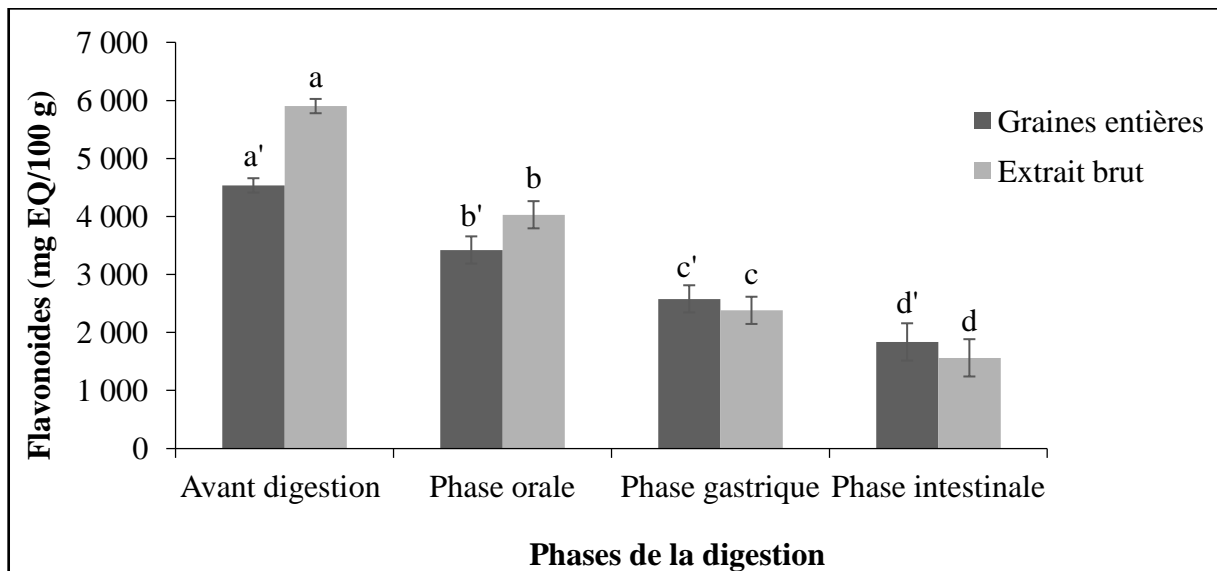


Figure 11. Teneur en flavonoïdes totaux de la poudre des graines entières et de l'extrait brut avant et après les différentes phases de digestion *in vitro*.

Avant la digestion, la teneur en flavonoïdes de la poudre est de $4534,89 \pm 0,046$ mg EQ /100g et celle de l'extrait brut est de $5901,95 \pm 0,016$ mg EQ/100g. Ces teneurs sont supérieures à ceux au cours de différentes phases de la digestion (orale, gastrique et intestinale).

Les résultats obtenus sont similaires à ceux de (**Bouayed et al., 2011**), qui ont montré que la teneur en flavonoïdes au cours de la digestion des quatre variétés de la pomme était inférieure par rapport à celle de l'extrait avant la digestion. Ainsi, **Dufour et al, (2014)** et **Page et al, (2014)**, ont trouvé que la teneur en flavonoïdes dans les fruits et les légumes est faible au cours des différentes phases de la digestion en comparaison avec la teneur de celle-ci avant la digestion. Par contre (**Ydjedd et al., 2017**) ont trouvé une augmentation des FT de la pulpe de caroube dans la phase orale vers la phase gastrique.

Les résultats obtenus peuvent être expliqués par ; les processus physiques (mastication, péristaltisme) et chimiques (hydrolyses chimiques et enzymatiques) associés à la digestion, tout comme les procédés de transformation (cuisson, mouture), ne suffisent pas à produire une déstructuration complète des parois cellulaires et des organites contenus dans la cellule, qui ne permet pas une solubilisation optimale des composés phénoliques. Selon (**González-Sarrías et al., 2015**) la biodisponibilité de ces composés est limitée par le PH du milieu et la présence des protéines.

Conclusion

Le pin d'Alep est une excellente source de composés phénoliques et présente une forte activité antioxydante, ces derniers sont influencés par plusieurs paramètres intrinsèques et extrinsèques (effets de la digestion).

Notre étude et nos recherches bibliographiques nous ont permis de mieux connaître les graines de *Pinus halepensis* Mill, leur composition chimique et leurs éventuelles activités biologiques, qui n'ont pas fait l'objet d'études approfondies.

L'objectif scientifique de ce travail était d'étudier *in vitro* les effets de la digestion sur l'activité antioxydante des composés phénoliques des graines de *Pinus halepensis* Mill . Au cours de cette étude, nous avons pu dégager les conclusions suivantes :

- La teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux de la poudre des graines entières du pin d'Alep est moindre par rapport à celle de l'extrait brut préparé à partir de ces mêmes graines et cela est constaté tout au long des trois phases de la digestion simulée *in vitro*. Effectivement, l'analyse statique confirme les résultats obtenus avec des valeurs significativement différentes.
- Les résultats obtenus montrent que les teneurs en CPT et en FT de l'extrait brut et de la poudre des graines entière de *Pinus halepensis* diminuent significativement ($p < 0,05$) après le processus de la digestion, ce qui montre l'influence des changements du pH et des enzymes digestives sur leur bioaccessibilité voir leur biodisponibilité dans l'intestin.

Les graines de *Pinus halepensis* Mill ayant fait l'objet de très peu d'étude scientifique cela reste une étude préliminaire qui nécessite des études complémentaires et approfondies dont de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- ✓ Faire une analyse des profils phénoliques des extraits avant et en cours des différentes phases de la digestion par la méthode HPLC MS/MS (chromatographie liquide de haute performance).
- ✓ Réalisation d'essais d'alimentation *in vivo* afin de confirmer les résultats de la présente étude. Ainsi que de se concentrer sur la digestion des polyphénols des graines de pin d'Alep en utilisant un modèle incluant une digestion microbienne du côlon afin d'obtenir des résultats qualitativement bien corrélés avec des études humaines.
- ✓ Utilisation de la technologie d'encapsulation pour améliorer la biodisponibilité des polyphénols ou pour obtenir une libération contrôlée de ces composés au cours de digestion.

Références bibliographiques

- Alsalvar C., Al-Farsi M., Quantick P.C., Shahidi F., Wiktorowicz R. (2005).** Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots. *Food Chemistry*. 89: 69-76.
- Aura A-M.(2005).** *In vitro* digestion models for dietary phenolic compounds. VTT Technical Research Centre of Finland Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., McClements, D.J. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. 125 : 1–12.
- BachirBey M.(2015).** Étude de l'effet du séchage sur les caractéristiques physicochimiques, les propriétés antioxydantes et les profils phénoliques de variétés de figes (*Ficus carica* L.). *Thèse de doctorat*. Université Abderrahmane Mira, Bejaïa, Algérie. p.130.
- Bahorun T.(1997).** Substances naturelles actives : la flore Mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research Council, 4 :83-94.
- Belyagoubi N.(2011)** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *Thèse de Doctorat en Biologie*, Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen. . 96p.
- Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E., Saykova I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachideshypogaea* L.) .*Revue de génie industriel* ,7 :35-45.
- Bouayed J., Hoffmann L., Bohn T. (2011).** Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*. 128:14–21.
- Bouayed J., Rammal H., Younos C., Dicko A., and Soulimani R. (2008).** Caractérisation et bioévaluation des polyphénols : nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Phytothérapie*. 6 : 71-74.
- Boudy P. (1952).** Guide du forestier en Afrique du Nord. Paris. Maison rustique, 509 p. 94.
- Boulaacheb N.(2009)** . Etude de la végétation terrestre et aquatique du djebel Meghriss (nord tellien algérien) : analyse floristique, phytosociologique et pastorale. *Thèse de doctorat d'état* , faculté des sciences , université ferhat abbas sétif . 332p.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., et Berset, C.(1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity . *International Journal of Food Science and Technolog.* 28: 25–30.

- Bublin, M, Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O., Mackie, A.R., Mills, E.N., Breiteneder, H. (2008).** Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein. *Molecular Nutrition and Food Research*. 52: 1130–1139.
- Chaalal M., Louaileche H., Touati N. and BachirBey M.(2013).** Phytochemicals, *in vitro* antioxidant capacity and antiradical potential of whole and ground seeds of three prickly pear varieties: comparative study. *Industrial Crops and Products*. 49: 386-391.
- Chaalal M., Touati N. and Louaileche H.(2012).** Extraction of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant capacity of prickly pear seeds. *Acta Botanica Gallic*. 12: 467–475.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M. et Chern, J.-C.(2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and drug analysis*. 10: 49-57.
- Cheikh-Rouhou S, Hentati B, Besbes S, Blecker C, Deroanne C and Attia H .(2006)** Chemical Composition and Lipid Fraction Characteristics of Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seeds Cultivated in Tunisia. A review. *International Journal of Food Science and Technology*. 15:407-416.
- Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I., Lacroix, C.(2006).** New three-stage *in vitro* model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *Fems Microbiology Ecology*. 57: 324–336
- Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., Paliyath, G. (2014).** Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. 165: 522–531.
- Cook J.(1998).** Nutraceuticals for Cardiovascular Health, *American Journal Cardiology*. 10: 43- 46
- Dacosta E.(2003).** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (éd). Paris, p317.
- Day A.J., Gee J.M., Dupont M.S., Johnson I.T., Williamson G.(2003).** Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical pharmacology*. 65: 1199-1206.
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S. et Ju, Y.-H.(2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content,

- total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and drug analysis*. 22:296–302.
- Dufour C., Page D., Gobert M., Rémond D., Loonis M., Buffière C. and Santé-Lhoutellier V. (2014).** Bioaccessibilité et propriétés antioxydantes des polyphénols et caroténoïdes des fruits et légumes dans le tractus digestif. *Innovations Agronomiques*. 36 : 69-82.
- Dupas C.(2005).** Influence des protéines laitières sur le pouvoir antioxydant et la biodisponibilité des polyphénols du café. *Thèse de doctorat* en sciences alimentaires. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires (ENSIA) : 260p.
- El Gharras H.(2009).** Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology* .44(12): 2512-2518.
- Farjon A,(1996)** Biodiversity of *Pinus (Pinaceae)* in Mexico: speciation and palaeo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 121:365-384.
- Frontela-Saseta, C., López-Nicolás, R., González-Bermúdez, C.A., Peso-Echarri, P., Ros-Berruezo, G., Martínez-Graciá, C., Canali, R., Virgili, F.(2011).** Evaluation of antioxidant activity and antiproliferative effect of fruit juices enriched with Pycnogenol® in cöloncarcinoma cells. The effect of *in vitro* gastrointestinal digestion. *journal of Phytotherapy Research* . 25: 1870–1875.
- Gee J.M. et Johnson I.T.(2001).** Polyphenolic compounds: interactions with the gut an implications for human health. *Current Medicinal Chemistry* .8: 1-182.
- Gobert D, Remond M, D Loonis. , M Buffière .(2014).** Bioaccessibilité et propriétés antioxydantes des polyphénols et caroténoïdes des fruits et légumes dans le tractus digestif. *Innovations Agronomiques*. 36: 69-82
- Gonthier M.P., Donovan J.L., Texier O., Felgines C., Remesy C., Scalbert A.(2003).** Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 35: 837-844.
- González-Sarriás A., García-Villalba R., Núñez-Sánchez M.Á., Tomé-Carneiro J., Zafrilla P., Mulero J., Tomás-Barberán F.A., Espín J.C.(2015).** Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: a crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *International Journal of Food*.19 : 225–235.
- Granese T., Cardinale F.; Cozzolino A., Pepe S., Ombra M.N., Nazzaro F., Coppola R., Fratianni F.(2014).** Variation of polyphenols, anthocyanins and antioxidant power in

- the strawberry grape (*Vitis labrusca*) after simulated gastro-intestinal transit and evaluation of *in vitro* antimicrobial activity. *Food Science and Nutrition* . 5 :50- 60.
- Guerra A., Etienne-Mesmin L., Livrelli V., Denis S., Blanquet-Diot S., Alric M.(2012).** Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*. 30: 591–600.
- Gullon, B., Pintado, M.E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., Viuda-Martos, M.(2015).** *In vitro* gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *J. Functional Foods* .19: 617–628.
- Heinonen S., Nurmi T., Liukkonen K., Poutanen K., Wähälä K., Deyama T., Nishibe S., Adlercreutz H.(2001).** *In vitro* metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. . *Food and Chemical Toxicology*. 49: 3178–3186.
- Hertog M. G., Feskens E.J. and Hollman P.C.(1993).** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *National library of Medicine National Institutes of Health*. 342:1007- 1011.
- Hollman P.C., Katan M.B.(1999).** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. 37: 937-942
- Javanovic S. and Steenken S.(1994).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of American Chemical Society*. 12: 4846-4851.
- Kadri N, Khettal B, Aid Y, Kherfellah S, Sobhi W and Barragan-Montero V.(2015).** Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food Chemistry* .188:184-192.
- Kamiloglu S. et Capanoglu E.(2013).** Investigating the *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in fresh and sun-dried figs (*Ficus carica* L.).*International Journal of Food Science and Technology*. 48: 2621–2629.
- Kamiloglu S.(2016).** Bioavailability and bioactivity of black carrot polyphenols using *in vitro* digestion models combined with a co-culture model of intestinal and endothelial cell lines. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Belgium. 219p.
- Kamiloglu S.et Capanoglu E.(2015).** Polyphenol content in figs (*Ficus carica* L.): Effect of sun-drying . *International Journal of Food Properties* . 18: 521–535.

- Kiers J.L., Nout R.M.J., Rombouts F.M. (2000).** *In vitro* digestibility of processed and fermented soya bean, cowpea and maize. *Journal of the Science in Food and Agriculture* . 80:1325–1331.
- Kobayashi H. Oikawa S., Hirakawa K., Kawanishi S.(2004).** Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate.*Mutation Research*. 558: 111-120.
- Kohler C.(2011).** L'appareil digestif. Université Médicale Virtuelle Francophone, p 4-18.
- Lampe J.W.(2003).** Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *Journal of Nutrition*. 139: 956S–964S.
- Laurent C., Besançon P., Caporiccio B.(2007).** Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . 100: 1704–1712.
- Leake D. S.(1998).** Flavonoids in Health and Disease, Second Edition; Effects of Flavonoids on the Oxidation of Low-Density Lipoproteins. *EBook ISBN: 978-1-43985811-0. pp 253-276.*
- Lu, W., Kelly, A.L., Miao, S. (2016).** Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends Food Science and Technology*. 47 : 1–9.
- Macheix J., Fleuriet A. and Allemand C. J.(2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed : Collection biologie, Presse polytechniques et universitaires romandes : 192p
- Maestrea FT, Cortina J, Bautista S and Bellota J .(2003)** .Does *Pinus halepensis* facilitate the establishment of shrubs in Mediterranean semi-arid afforestations? *Forest Ecology and Management*.176:147-160.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.(2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* . 7: 727–747.
- Manach C., Scalbert A., Remesy C., Morand C.(2006).** Consommation et disponibilité des polyphénols. In: *Les polyphénols en agroalimentaire*. P. Sarni-Manchado and V. Cheynier (Ed).Paris, Lavoisier. Pp , 361–380.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C.(2005).** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 230S-242S.

- Martens S ., Mithöfer A.(2005).** Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*. 66 :145-222.
- Martin S., Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* . 51 : 304-315.
- Minekus M., Smeets-Peeters M., Bernalier A., Marol-Bonnin S., Havenaar R., Marteau P., Alric M., Fonty G.(1999).** A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Journal of Application of Microbiology and Biotechnology*. 53: 108–114.
- Mishra K., Ojha H., et Chaudhury N.K.(2012).** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . 130: 1036–1043.
- Nagavani V., Madhavi Y., Rao D.B., Rao P.K., Rao, T.R.(2010).** Free radical scavenging activity and qualitative analysis of polyphenols by RP-HPLC in the flowers of *Couroupita guianensis* Abul. *Electron. J. Environ. Journal of Agricultural and Food Chemistry* . 9:52-61.
- Nahal I.(1962)** .Etude taxonomique, phytogéographique écologique et sylvicole, in *école Nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences* .399–2407.
- Nasri N., Khaldi A., Fady B., Triki S .(2015)** .Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.:composition and population profiling. *phytochemistry* .66:1729-1735.
- Nergiz C., İclalDönmez .(2004).** Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food chemistry* .86:365-368.
- Ortega N., Macià A., Romero M.-P., Reguant J., Motilva M.-J.(2011).** Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . 124: 65–71.
- Oyaizu M.(1986).** Studies on products of browning reaction. *The Japan Journal of Nutrition and Dietetique* . 44 : 307–315.
- Page D., Gobert M., Remond D., Loonis M., Buffière. (2014).** Bioaccessibilité et propriétés antioxydantes des polyphénols et caroténoïdes des fruits et légumes dans le tractus digestif. *Innovations Agronomiques*. 36 :69-82.
- Parde J ., Bouchon J. (1988).** Dendrométrie. 2ème ed.E.N.G.R.E.F. , Nancy ,328p
- Parde J, (1961).** Dendrométrie. E.N.E .F., Nancy.328p.39.

- Peters U., Poole C., Arab L.(2001).** Does tea affect cardiovascular disease? A metaanalysis. *American Journal of Epidemiology*. 154: 495-503.
- Pietta P. G. (2000).** Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63 : 1035-1042.
- Poulin M. J., Bel-Rhlid R., Piché Y ., Chênevert R .(1993).** Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedlings stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of optimal CO2 enrichment. *Journal of Chemical Ecology*. 19 (10): 2317-2327.
- Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin C., Bailleul F. and Trotin F.(2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*. 75 : 35-42.
- Quezel P.(1986).** Les pins du groupe —*Halepensis* Ecology, Végétation, Ecolphysiologie. CIHEAM-Options Méditerranéennes. pp. 11-23.
- Qusti S.Y., Abo-Khatwa A.N., Lahwa M.B.(2010).** Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran. *EJBS* .2 : 41–51.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. et Ribéreau-Gayon P.(1982).** Composés phénoliques. In «Traité d’oenologie, sciences et techniques du vin ». Edition Dunod, 477-499.
- Rice-Evans C. (1999).** Screening of phenolics and flavonoids for the antioxidant activity. In « Antioxidant and food supplement in human health ». Edition :Elsevier. Pp324
- Rice-Evans C. and Miller N.(1996).** Antioxydant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Trans*: 790-795p.
- Richelle M., Steiling H., Castiel I.(2009).** Bioavailability and Skin Bioefficacy of Vitamin C and E, in: Nutritional Cosmetics. Elsevier, pp. 115–138.
- Rumney C.J., Rowland I.R.(1992).** *In vivo* and *in vitro* models of the human colonic flora. . *Journal of Food Science and Nutrition* . 31 :299–331.
- Scalbert A. (2004).** Fruits et légumes, polyphénols et santé. Professeur agrégée (Laboratoire des maladies métaboliques et micronutriments, INRA, centre de recherche de Clermont-Ferrand/Theix), *relu par Ed : Florentin* : 1-7p.239- 253.
- Scalbert A., Williamson G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of nutrition*. 130: 2073S–2085S.

- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A.R., Simonič M., Knez Ž. (2005).** Phenols proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 89: 191–198.
- Spencer J.P.E., Abd El Mohsen M.M., Rice-Evans C. (2004).** Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 423: 148-161.
- Stoupi S., Williamson G., Viton F., Barron D., King L.J., Brown J-E., Clifford M.N. (2010).** *In vivo* bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [14C] procyanidin B2 in male rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 38(2): 287-291.
- Telli A., Mahboub N., Boudjneh S., Siboukeur O.E.K., Moulti-Mati F. (2010).** Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dates lyophilisées (Phoenix dactylifera L) variété Ghras. *Annales des sciences et technologie*. 2(2):107-114.
- Unno T., Tamemoto K., Yayabe F., Kakuda T. (2003).** Urinary excretion of 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, a ring-fission metabolite of (-)-epicatechin, in rats and its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:6893–6898
- Vermerris W. et Nicholson R. (2006).** Phenolic Compound Biochemistry (Springer Netherlands). 276p.
- Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A., Galvano F., Gallo A., Scalfi L., Fogliano V. (2007).** Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *Journal of Nutrition*. 137: 2043-2048
- Williamson G., Clifford M-N. (2010).** Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*. 104: S48-S66.
- Ydjedd S. (2018).** Etude de l'effet de la microencapsulation et de la digestion gastro-intestinale *in vitro* sur la bioactivité des extraits phénoliques de la pulpe de la caroube (*Ceratonia siliqua* L.) et modulation du microbiote colique. *Thèse de doctorat*, Université de Béjaia, 28, 29, 37.
- Ydjedd S., Bouriche S., Ruben L.N., Carmen F.S., Teresa S.M., Gaspar R.B, Rezgui F., Louaileche H., and Kati D.E. (2017).** Effect of *in Vitro* Gastrointestinal Digestion on Encapsulated and Non encapsulated Phenolic Compounds of Carob (*Ceratonia siliqua*

L.) Pulp Extracts and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.65: 827–835.

Yildirim, A., Oktay, M., and Bilaloglu, V.(2001). The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turkish Journal of Medical Science*. 31 : 23–27.

Zenzen W. (2016). Utilisation du S.I.G pour l'analyse de la structure de la forêt de Ouennougha dans la Wilaya de Bordj Bou Arréridj, mémoire, master en foresterie ,univ. Tlemcen 60p.

Annexe

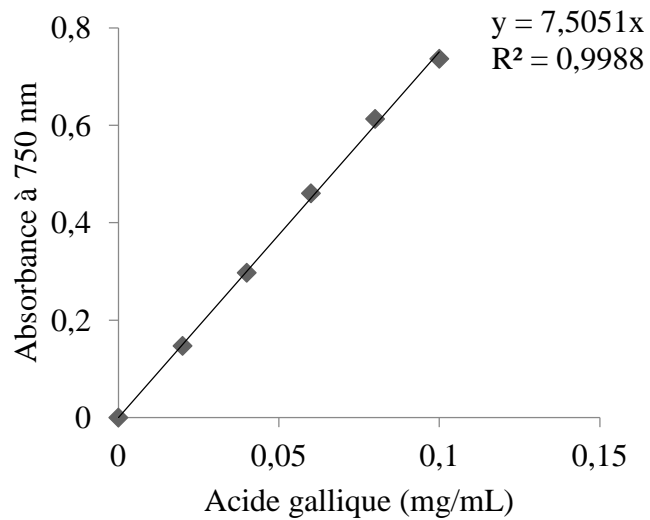


Figure 01 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

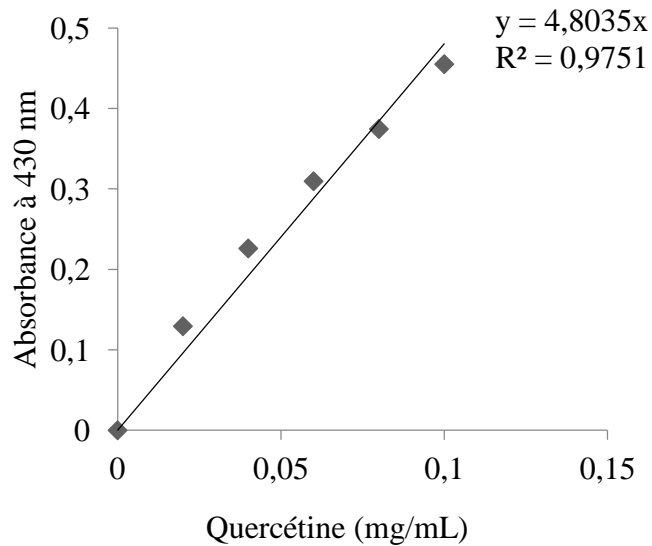


Figure 02 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Résumé

Le pin d'Alep est une espèce appartenant exclusivement au bassin méditerranéen, il est considéré comme une source importante de composés bioactifs qui possède plusieurs vertus grâce aux composés phénoliques. Toutefois, le transit digestif pourrait influencer la stabilité et la biodisponibilité de ces composés affectant ainsi leurs bienfaits sur la santé. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la digestion gastro-intestinale *in vitro* sur le potentiel antioxydant des composés phénoliques des graines de pin d'Alep. Les résultats obtenus montrent que les teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux de la poudre des graines entières et de l'extrait brut diminuent significativement après le processus de digestion suite aux actions physiques et chimiques qu'ils subissent tout au long de cette digestion.

Mots clés : graines de pin d'Alep ; digestion gastro-intestinale *in vitro* ; composés phénoliques.

Abstract

The Aleppo pine is a species belonging exclusively to the Mediterranean basin, it was considered as an important source of bioactive compounds that has several virtues due to its richness in phenolic compounds. However, the digestive transit could influence the stability and the bioavailability of these compounds affecting thus their health benefits. The aim of the present investigation was to evaluate the effect of *in vitro* gastro-intestinal digestion on the antioxidant potential of phenolics compounds of the Aleppo pine seeds. The results obtained showed that the total phenolic compounds and flavonoids contents of the Aleppo pine seeds and crud extract decrease significantly after the digestion process because of the physical and chemical actions, which they undergo throughout this digestion.

Keywords: Aleppo pine seeds; *in vitro* gastro-intestinal digestion; phenolic compounds.

ملخص

الصنوبر هو نوع ينتمي حصريا الى حوض البحر الأبيض المتوسط. ويعتبر مصدرا مهما للمركبات النشطة بيولوجيا والتي لها فضائل عديدة بفضل ثرائها بالمركبات الفينولية. غير أن عملية الهضم قد تؤثر على الاستقرار والتوافر البيولوجي لهذه المركبات وبالتالي تؤثر على فوائدها الصحية. الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير الهضم المعوي في المختبر على القدرة المضادة للأكسدة للمركبات الفينولية المتواجدة في بذور الصنوبر. النتائج المتحصلة عليها تظهر ان كمية البوليفينول والفلافونويد العامة لبذور الصنوبر وكذا المستخلصات تظهر انخفاض كبير بعد عملية الهضم متأثرين بالهضم الفيزيائي والكيميائي.

الكلمات المفتاحية: الصنوبر؛ الهضم المخبري؛ المركبات الفينولية