

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2019

**THÈSE**

Présentée par

**MEZITI Hicham**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOCHIMIE**

**THÈME**

**Effets biologiques des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex***

Soutenue publiquement le **09 /12 /2019**

DEVANT LE JURY

Président	<b>Sobhi Widad</b>	<b>M.C.A. Univ Sétif 1</b>
Directeur	<b>Senator Abderrahmane</b>	<b>Pr. Univ Batna2</b>
Codirecteur	<b>Bouriche Hamama</b>	<b>Pr. Univ Sétif 1</b>
Examineurs	<b>Zaama Djamila</b>	<b>Pr. Univ Constantine</b>
	<b>Khettal Bouchra</b>	<b>Pr. Univ Bejaia</b>

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

# Remerciements

C'est avant tout grâce à Allah que ce travail a pu être réalisé.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Professeur Senator Abderrahmane. Je le remercie pour sa disponibilité et son suivi tout au long de mes années de recherche qui ont permis de mener à terme ce travail. Je le remercie beaucoup d'avoir consacré du temps à la lecture et à la correction de ce document. Je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance Merci monsieur.

J'adresse mes sincères remerciements à mon codirecteur de thèse, Pr Bouriche Hamama qui a guidé et surveillé le déroulement et l'exécution de ce travail en me prodiguant toute aide possible, et en me consacrant de son temps précieux ses conseils et ses critiques depuis l'entame de mes études supérieures

Merci infiniment madame.

Je tiens à remercier Docteur Sobhi Widad d'avoir accepté d'être président du jury. Je tiens à exprimer également ma gratitude aux membres du jury : Pr Zaama Djamila et Pr Khettal Bouchra d'avoir accepté de juger mon travail.

Un grand merci pour tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans la concrétisation de ce travail:

## ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو تحديد التركيب الكيميائي النباتي وتقييم التأثيرات البيولوجية للمستخلص الميثانولي للحاء جذور نبات *Quercus ilex* (QIE) ومستخلص المخاريط الأنثوية لنبات *Pinus halepensis* (PHE). أوضحت الدراسة الكيميائية النباتية للمستخلصات أنها تحتوي على نسبة كبيرة من المركبات الفينولية والفلافونويدات. أظهر تحليل HPLC وجود الكاتشين وخمسة أحماض فينولية في QIE. وقد تم التعرف على الكاتشين وحمض السيناميك في PHE. تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة لمستخلصات *Pinus halepensis* و *Quercus ilex* من خلال تحديد أنشطة الكسح لجذور DPPH و ABTS والفعالية المضادات الأوكسدة بإرجاع الحديد (FRAP). وكانت قيم IC50 مع DPPH مساوية لـ 5.69 ميكروغرام / مل مع QIE و 18.88 ميكروغرام/مل مع PHE. كانت القدرة المضادة للأوكسدة ضد جذر ABTS هي 4.13 و 1.15 ملي مول مكافئ ترولوكس/ملغم مستخلص QIE و PHE على التوالي. كما أظهرت المستخلصات المدروسة قدرة كبيرة على إرجاع الحديد. بالإضافة إلى ذلك، فقد ثبت أن كلا المستخلصين لهما تأثير وقائي كبير ضد تحلل كريات الدم الحمراء الناجم عن AAPH، مع زيادة في زمن نصف انحلال الدم (HT50) بشكل مرتبط بالجرعة. بلغت قيمة HT50 المسجلة 93.63 دقيقة و 143.6 دقيقة لـ EPH و EQI بتركيز 75 ميكروغرام / مل، مقارنة بـ 30.22 دقيقة للعينات غير المعالجة. أظهرت المستخلصات التي تمت دراستها أيضاً أنشطة جيدة في حماية الحمض النووي من الأوكسدة الناجمة عن التحلل الضوئي لبيروكسيد الهيدروجين الناجم عن الأشعة فوق البنفسجية. أعطى العلاج عن طريق الفم للفئران بالمستخلصات PHE و EQI تأثير مضاد لالتهاب الأذن المحفز بالكزيلان مع معدلات تثبيط من 40.15% و 28.78% لوذمة الأذن على التوالي. من جانبه، أدى التطبيق الموضعي لكلا المستخلصين في نموذج التهاب الأذن الناجم عن زيت الكروتون إلى تقليل الالتهاب بنسبة 69.66% و 41.74% على التوالي. تم تأكيد النشاط المضاد للالتهاب من خلال اختبارات تقييم تأثيرات المستخلصات التي تمت دراستها على وظائف الخلايا البيضاء المتعادلة البشرية. أظهر كلا المستخلصين تثبيطاً كبيراً ويعتمد على الجرعة في نشاط إنزيم الإيلاستاز و إنزيم الميالوبيروكسيداز. تبين أن المستخلصين قادرين على تثبيط الانفجار التنفسي (IC50 = 21.55 ميكروغرام / مل و 6.46 ميكروغرام / مل بالترتيب). ومع ذلك، في اختبار البلعمة الخلوية لخلايا خميرة *Candida Albicans* من قبل الخلايا المتعادلة البشرية، أظهرت المستخلصات التي تمت دراستها تثبيطاً طفيفاً وغير معنوي لنسبة البلعمة، و لمؤشر البلعمة.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن مستخلصات *Pinus halepensis* و *Quercus ilex* تمتلك تأثيرات معتبرة مضادة للأوكسدة، مضادة لتحلل كريات الدم الحمراء، واقية للحمض النووي ومضادة للالتهاب كما تمثل مصدراً لمركبات النشطة بيولوجياً يمكنها أن تستعمل في تطبيقات علاجية مهمة.

**الكلمات المفتاحية:** *Pinus halepensis*، *Quercus ilex*، مضادات الأوكسدة، مضادات التحلل، الوقاية الجينية، مضادات الالتهاب.

## Résumé

La présente étude vise à déterminer la composition phytochimique ainsi qu'à évaluer les effets biologiques de l'extrait méthanolique de l'écorce des racines de *Quercus ilex* (EQI) et de l'extrait des jeunes cônes femelles de *Pinus halepensis* (EPH). L'étude phytochimique a montré que ces extraits présentent une teneur considérable en composés phénoliques et en flavonoïdes. L'analyse par HPLC a permis d'identifier la catéchine et cinq acides phénoliques dans l'EQI. La catéchine et l'acide cinnamique ont été identifiés dans le EPH. Les activités antioxydantes *in vitro* ont été évaluées par les tests de DPPH, l'ABTS et le FRAP. Les IC50 obtenues avec l'essai de DPPH sont de 5,69 µg/ml pour EQI et de 18,88 µg/ml pour EPH. La capacité antioxydante contre le radical ABTS est de 4,13 et de 1,15 mM équivalent trolox /mg de EQI et EPH respectivement. Les extraits étudiés ont également montré une capacité considérable de réduction de fer. De plus, il a été démontré que les deux extraits exercent un effet protecteur important contre l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH, avec une bonne corrélation entre la dose et le temps de demi-hémolyse (HT50). La valeur HT50 obtenue est de 93,63 min et 143,6 min pour EPH et EQI respectivement à une concentration de 75µg/ml, contre 30,22 min pour le témoin (non traité). Les extraits étudiés ont également présenté une bonne activité protectrice de l'ADN vis-à-vis de l'oxydation induite par photolyse de peroxyde d'hydrogène par les UV. Le traitement par voie orale des souris par les extraits de *Pinus halepensis* et de *Quercus ilex* a donné un effet anti-inflammatoire avec des taux d'inhibition de l'œdème de 40,15% et 28,78% respectivement. L'application topique des deux extraits a réduit de 69,66% et 41,74% respectivement, l'inflammation de l'oreille induite par l'huile de croton. L'activité anti-inflammatoire a été confirmée par une évaluation des effets des extraits étudiés sur les fonctions du neutrophile humain. Les deux extraits ont montré une inhibition significative et dose dépendante de l'activité de l'élastase et de la myéloperoxydase des neutrophiles. La flambée respiratoire est également inhibée par EPH et EQI (IC50 : 21,55 µg/ml et 6,46 µg/ml). Cependant, dans le test de phagocytose de *Candida albicans* par les neutrophiles humains, les extraits étudiés ont montré une faible inhibition (non significative) de l'indice de phagocytose et du pourcentage de phagocytose. Les résultats obtenus montrent que les extraits de *Quercus ilex* et de *Pinus halepensis* possèdent des effets antioxydant, antihémolytique, genoprotecteur et anti-inflammatoire et représentent une importante source de composés bioactifs pouvant avoir des applications thérapeutiques intéressantes.

**Mots clés :** *Pinus halepensis*, *Quercus ilex*, antioxydant, antihémolytique, genoprotection, anti-inflammatoire.

## Abstract

The purpose of this study is to determine the phytochemical composition and to evaluate the biological effects of the *Quercus ilex* root bark methanolic extract (QIE) and *Pinus halepensis* female cone extract (PHE). The phytochemical study of the extracts showed that they contain considerable amounts of phenolic compounds and flavonoids. HPLC analysis allowed the identification of catechin and five phenolic acids in the QIE. Catechin and cinnamic acid have been identified in PHE. The in vitro antioxidant activities of the extracts were evaluated by DPPH, ABTS and ferric/antioxidant reduction potency (FRAP) assays. The IC<sub>50</sub> values in the DPPH assay were 5.69 µg/ml for QIE and 18.88 µg/ml for PHE. The antioxidant capacity against the ABTS radical was 4.13 and 1.15 mM trolox equivalent/mg OIE and PHE respectively. The studied extracts showed also considerable iron reduction capacity. In addition, both extracts have been shown to exert a significant protective effect against AAPH-induced erythrocyte hemolysis, with a good correlation between concentration and half-hemolysis time (HT50). The recorded HT50 value reached 93.63 min and 143.6 min for PHE and QIE at a concentration of 75 µg/ml, versus 30.22 min for the control (untreated). The studied extracts also showed a good DNA protective activity against oxidation induced by UV photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Oral treatment of mice with the extracts of *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* gave an anti-inflammatory effect with edema inhibition rates of 40.15% and 28.78%, respectively. Topical application of both extracts reduced by 69.66% and 41.74% respectively, the ear inflammation induced by croton oil. The anti-inflammatory activity was confirmed by evaluating the effects of the studied extracts on human neutrophil functions. Both extracts showed significant and dose-dependent inhibition of elastase activity and neutrophil myeloperoxidase. The respiratory burst is also inhibited by PHE and QIE (IC<sub>50</sub>: 21.55 µg/ml and 6.46 µg/ml). However, in the candida albicans phagocytosis by human neutrophils test, the studied extracts showed a slight and insignificant inhibition of the phagocytosis index and percentage of phagocytosis. The obtained results showed that the extracts of *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* possess considerable antioxidant, antihemolytic and genoprotective and anti-inflammatory effects, and represent an important source of bioactive compounds with potential interesting therapeutic applications.

**Key words :** *Pinus halepensis*, *Quercus ilex*, antioxidant, antihemolytic, genoprotection, anti-inflammatory.

## Liste des abréviations

**AAPH** : 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

**ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**AINS**: Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

**AIS**: Anti-inflammatoires stéroïdiens.

**AP-1**:Protéine activatrice1

**C. albicans**: *Candida albicans*

**CB**: Cytochalisine B

**COX**:Cylooxygenase

**CR**: Complement Receptor

**DMSO**: Dimethyl Sulfoxyde.

**DPPH**: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl.

**EAG**: Equivalent d'acide gallique

**EAT** : Equivalent acide tannique

**EPH**: Extrait de *Pinushalepensis*

**EQ** : Equivalent quercitine

**EQI**: Extrait de *Quercus ilex*

**ERN**: Espèce réactive d'azote

**fMLP** : formyl--méthionyl-leucyl-phénylalanine

**f-MLP**:formyl-Mét-Leu-Phé)

**FRAP** : Pouvoir anti-oxydant par réduction du fer

**GRs** : Récepteurs des glucocorticoïdes

**GSH**:Glutathion

**GSSG**: Glutathion dissulfide

**HIF** : Facteur inductible par l'hypoxie

**HPLC-TOF-MS**:High Performance Liquid Chromatography Time of Flight-Mass Spectrometry.

**HT<sub>50</sub>**:Temps de demi-Hémolyse

**HTAB** : Hexadecyltrimethylammoniumbromide

**IC<sub>50</sub>**:Concentrationinhibitrice a 50%

**ICAM**: Inter Cellular AdhesionMolecule

**IL**: Interleukine

**INF**: Interféron

**iNOS:** Oxyde nitrique synthase inductible

**Lox:**Lipooxygénase

**LPS:**Lipopolysaccharides

**LTB:** Leucotriène.

**MBP:** Major basic proteins

**MPO:**Myéloperoxydase

**NF- $\kappa$ B:** facteur de transcription nucléaire  $\kappa$ B

**OCDE:** Organisation de Coopération et de Développement Economiques

**PAF:** Facteur activateur des plaquettes

**PBS :** Tampon phosphate

**PMA:** Phorbol 12-myristate 13-acétate

**PMNs :**Polymorphonucléaires neutrophiles

**PNs:**Polynucléaires neutrophiles

**ROS:** Espèce réactive d'oxygène

**SDA :** milieu sabouraud dextrose agar

**SNAP :** Soluble NSF attachment protein

**SNARE :** SNAP receptorproteins

**TEAC :** capacité antioxydante équivalente au Trolox

**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor-  $\beta$

**TNF:** Facteur de necrose tumoral

**VCAM:**Vascular Cell Adhesion Molecule-1

**VEGF:** Vascular endothelial growth factor

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Cibles moléculaires des radicaux libres .....	4
<b>Figure 2.</b> Pathologies associées au stress oxydant .....	7
<b>Figure 3.</b> Etapes de l'inflammation aigue.....	9
<b>Figure 4.</b> Photographie sous microscope photonique du neutrophile humain .....	15
<b>Figure 5.</b> Mécanisme de migration trans-endothéliale du neutrophile .....	16
<b>Figure 6.</b> Destruction des pathogenes au sein du phagosome par mobilisation de systèmes bactéricides ....	18
<b>Figure 7.</b> Mécanisme moléculaire de la dégranulation du neutrophile .....	19
<b>Figure 8.</b> Photographie de <i>Pinus halepensis</i> de la région de Medjana (BBA).....	21
<b>Figure 9.</b> Photographie de <i>Quercus ilex</i> dans la région de Medjana (BBA).....	24
<b>Figure 10.</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine .....	28
<b>Figure 11.</b> Droite d'étalonnage de l'acide tannique.....	29
<b>Figure 12.</b> Droite d'étalonnage du trolox et de FeSO <sub>4</sub> .....	32
<b>Figure 13:</b> Etapes d'isolement des neutrophiles à partir du sang humain.....	38
<b>Figure 14.</b> Chromatogramme obtenu par HPLC des extraits de <i>Quercus Ilex</i> et de <i>Pinus halepensis</i> .....	43
<b>Figure 15.</b> Effet scavenger du radical DPPH des extraits de <i>Quercus ilex</i> et de <i>Pinus halepensis</i> .....	46
<b>Figure 16.</b> Effet inhibiteur des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> sur l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH.....	49
<b>Figure 17.</b> Effet des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et de <i>Quercus ilex</i> sur l'oxydation de l'ADN induite par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV.....	51
<b>Figure 18.</b> Effet des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris.....	53
<b>Figure 19.</b> Effet des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.....	55
<b>Figure 20.</b> Cytototoxicité des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et de <i>Quercus ilex</i> sur les neutrophiles.....	58
<b>Figure 21.</b> Effet des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> sur l'activité de l'élastase.	60
<b>Figure 22.</b> Effet des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> sur l'activité de la myéloperoxydase.....	63

<b>Figure 23.</b> Effet des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> sur la flambée respiratoire des neutrophiles.....	65
<b>Figure 24.</b> Photographie prise sous microscope optique montrant l'ingestion de <i>Candida albicans</i> par les neutrophiles.....	67
<b>Figure 25</b> Effet des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> sur la phagocytose de <i>C. albicans</i> par les neutrophiles.....	68

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Teneur des extraits de <i>Pinus halepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins.....	41
<b>Tableau 2.</b> Composés phénoliques identifiés par HPLC dans les extraits de <i>Quercus ilex</i> et de <i>Pinus halepensis</i> .....	43
<b>Tableau 3.</b> Effet scavenger du DPPH et de l'ABTS et activité antioxydante par réduction du fer des extraits de <i>Quercus ilex</i> et de <i>Pinus halepensis</i> .....	47

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	1
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. Stress oxydant</b> .....	2
I.1. Radicaux libres et espèces réactives .....	2
I.2. Rôles physiologiques des ROS.....	3
I.3. Conséquences biologiques du stress oxydant.....	3
I.3.1. Oxydation de l'ADN.....	3
I.3.2. Peroxydation lipidique.....	3
I.3.3. Oxydation des protéines.....	4
I.3.4. Oxydation des glucides.....	5
I.4. Antioxydants .....	6
I.5. Stress oxydant et pathologies.....	6
I.6. Relation stress oxydant et inflammation.....	6
<b>II. Inflammation</b> .....	7
II.1. Inflammation aigue.....	8
II.1.1.Phase vasculaire.....	10
II.1.2. Phase cellulaire .....	10
II.1.3. Phase de résolution.....	11
II.2. Inflammation chronique.....	11
II.3. Inflammation et pathologies.....	12
II.4. Traitement de l'inflammation.....	12
II.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	12
II.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	12
II.4.3. Anti-inflammatoires naturels.....	13
<b>III. Neutrophile</b> .....	14
III.1. Fonctions du neutrophile.....	15
III.1.1. Migration vers le site de l'inflammation.....	15
III.1.2. Phagocytose de l'agent pathogène.....	16
III.1.3. Dégranulation.....	17
III.1.4. Flambée respiratoire.....	20
<b>IV. Plantes étudiées</b> .....	20
IV.1. <i>Pinushalepensis</i> .....	20

IV.1.1. Description et classification botanique.....	20
IV.1.2. Usage traditionnel.....	21
IV.1.3. Phytochimie et propriétés biologiques.....	22
IV.2. <i>Quercus ilex</i> .....	23
IV.2.1. Description et classification botanique.....	23
IV.2.2. Usage traditionnel.....	23
IV.2.3. Phytochimie et propriétés biologiques.....	24

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **I. Matériel**

I.1. Matériel végétal.....	26
I.2. Animaux.....	26
I.1. Sang humain.....	26
I.4. Microorganismes.....	27

#### **II. Méthodes**

II.1. Préparation des extraits de <i>Pinushalepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> .....	27
II.2. Analyses phytochimiques.....	27
II.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	27
II.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	27
II.2.3. Dosage des tanins.....	29
II.2.4. Analyse HPLC.....	29
II.3. Toxicité aigue des extraits de <i>Pinushalepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> .....	30
II.4. Activité antioxydante des extraits de <i>Pinushalepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> .....	30
II.4.1. Test de DPPH.....	30
II.4.2 Réduction du radical cation ABTS <sup>+</sup> .....	30
II.4.3. Pouvoir anti-oxydant par réduction du fer (FRAP).....	31
II.4.4. Test d'hémolyse.....	31
II.4.5. Test de l'oxydation de l'ADN induite par la photolyse de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	33
II.5. Activité anti-inflammatoire.....	34
II.5.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris.....	34
II.5.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.....	34
II.6. Effet des extraits de <i>Pinushalepensis</i> et <i>Quercus ilex</i> sur les fonctions du neutrophile.....	35
II.6.1. Isolement des neutrophiles humains.....	35

II.6.2. Viabilité des neutrophiles isolés.....	35
II.6.3. Pureté des neutrophiles isolés.....	35
II.6.4. Cytotoxicité des extraits de <i>Pinushalepensis</i> et <i>Quercusilex</i> .....	37
II.6.5. Effet sur l'activité de l'élastase.....	37
II.6.6. Effet sur l'activité de la myéloperoxydase.....	37
II.6.7. Effet sur la flambée respiratoire.....	38
II.6.8. Test de phagocytose.....	38
II.7. Analyses statistiques.....	39

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

<b>I. Analyse phytochimique.....</b>	<b>40</b>
I.1. Dosage des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes et des tanins.....	40
I.2. Analyse HPLC.....	41
<b>II. Toxicité des extraits de <i>Pinushalepensis</i> et <i>Quercus ilex</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>III. Activité antioxydante des extraits de <i>Pinushalepensis</i> et <i>Quercus ilex</i>.....</b>	<b>44</b>
III.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	44
III.2. Réduction du radical cation ABTS <sup>•+</sup> .....	45
III.3. Pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP).....	47
III.4. Effet anti-hémolytique.....	47
III.5. Effet sur l'oxydation de l'ADN induite par la photolyse du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
<b>IV. Activité anti-inflammatoire des extraits de <i>P. halepensis</i> et <i>Q. ilex</i>.....</b>	<b>52</b>
IV.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris.....	52
IV.2. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.....	54
<b>V. Effet des extraits de <i>P.halepensis</i> et <i>Q.ilex</i> sur les fonctions du neutrophile.....</b>	<b>57</b>
V.1. Préparation des neutrophiles humains.....	57
V.2. Toxicité des extraits de <i>P.halepensis</i> et <i>Q. ilex</i> sur les neutrophiles.....	58
V.3. Effet sur l'activité de l'élastase.....	59
V.4. Effet sur l'activité de la myéloperoxydase.....	61
V.5. Effet sur la flambée respiratoire.....	64
V.6. Effet sur la phagocytose .....	66
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>69</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>71</b>

## Introduction

La médecine traditionnelle est le cumul de connaissances, de compétences et de pratiques basées sur l'expérience des peuples, utilisées pour traiter et prévenir les maladies. Bien que les plantes occupent la position la plus importante dans les différentes pratiques de la médecine traditionnelle, seulement 1 à 10% des 500 000 espèces végétales existantes sur terre sont utilisées par l'homme à des fins thérapeutiques ou culinaires (Majaz et khurshid, 2016). Ainsi, il est bien évident que la recherche dans le domaine des plantes médicinales est toujours prometteuse pour développer de nouveaux remèdes naturels contre diverses affections et avec moins d'effets secondaires comparés aux substances chimiques de synthèse.

Les espèces réactives d'oxygène sont produites par les organismes vivants au cours du métabolisme cellulaire normal. Aux concentrations faibles à modérées, elles participent à des processus physiologiques, mais aux concentrations élevées, elles entraînent l'altération des composants cellulaires, tels que les lipides, les protéines et l'ADN. La perte de l'équilibre entre oxydants et antioxydants en faveur des oxydants, appelé stress oxydant, contribue à l'apparition de nombreuses pathologies, notamment le cancer, les troubles neurologiques, l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, la fibrose pulmonaire idiopathique et la maladie pulmonaire obstructive chronique (Birben *et al.*, 2012). Les métabolites secondaires des plantes, principalement les composés phénoliques possèdent des effets antioxydants considérables, ce qui explique en partie les effets thérapeutiques des plantes médicinales riches en ces métabolites (Pandea *et al.*, 2018).

La réaction inflammatoire est un processus physiologique de défense de l'organisme qui survient suite à une agression qui entraîne une altération de l'homéostasie tissulaire tel que les infections microbiennes ou les lésions tissulaires (Khanna *et al.*, 2014). Elle est indispensable à la défense de l'organisme, mais dans le cas où elle échappe à la régulation, l'inflammation participerait au développement de plusieurs maladies tel que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin, et les maladies neurodégénératives (Laveti *et al.*, 2013). La recherche de plantes médicinales et de substances ou molécules naturelles douées d'activités anti-inflammatoires, et possédant peu ou pas d'effets secondaires serait d'un grand intérêt pour la santé et le bien-être de l'homme.

L'objectif de la présente étude consiste à faire une étude phytochimique et à évaluer les effets antioxydants, anti-hémolytiques, anti-inflammatoires et gènes-protecteurs des extraits méthanoliques de *Pinus Halepensis* et *Quercus ilex*, très utilisées en médecine traditionnelle algérienne.

## I. Stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires (réactives) de l'oxygène (ROS) et les capacités cellulaires antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production des ROS et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (Migdal et Serres, 2011 ; Wu *et al.*, 2015).

### I.1. Radicaux libres et espèces réactives

Les radicaux libres sont des espèces chimiques ayant un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs couches externes, ce qui leur confère une grande instabilité et une forte réactivité (Birben *et al.*, 2012), de ce fait, ils vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en arrachant un électron à partir d'autres molécules (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). La molécule agressée devient à son tour radicalaire et peut donc agresser d'autres molécules provoquant ainsi une perturbation de l'organisme (Phaniendra *et al.*, 2015).

La notion de radicaux libres incluent d'une part, les espèces réactives de l'oxygène représentées par, l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ), les radicaux peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ), les lipideperoxyde ( $LOO^{\bullet}$ ), et les radicaux alkoxyde ( $RO^{\bullet}$ ), et d'autre part les radicaux libres azotés comme le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ) et le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\bullet}$ ). Les classes des espèces réactives d'oxygène ou de l'azote incluent également d'autres espèces réactives non radicalaire mais délétères pour l'organisme tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'ozone ( $O_3$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) et le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ) (Duan et Casper, 2010 ; Sen et Chakraborty, 2011).

### I.2. Rôles physiologiques des ROS

Plusieurs types de cellules produisent des ROS d'une manière constitutive au cours de leur métabolisme normal. D'autres types cellulaires les produisent en réponse à des stimuli spécifiques. A des concentrations faibles ou modérés, les ROS interviennent et sont même indispensables dans plusieurs fonctions physiologiques (Phaniendra *et al.*, 2015).

Les radicaux libres et les espèces réactives contribuent à la défense contre les infections. En effet, au sein des phagocytes, la NADPH produit du  $O_2^{\bullet-}$  qui est ensuite transformé par la SOD en  $H_2O_2$ , qui par la myéloperoxydase des neutrophiles peut être convertit en  $HOCl$  qui à son tour peut alors former spontanément le radical hydroxyle (Trachootham *et al.*, 2008 ; Lloyd *et al.*, 2013). Ces substances constituent un mélange très corrosif qui permet de détruire les bactéries ou les parasites ingérés.

Les ROS sont également essentiels pour la régulation d'un nombre de fonctions physiologiques tel que la progression du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. De plus, les ROS sont impliqués dans le maintien de la balance redox et dans l'activation de nombreuses voies de signalisation et de facteurs de transcription incluant le PI3K/Akt, les MAP Kinases, le NF- $\kappa$ B et le facteur suppresseur de tumeurs, le p53, qui peut activer l'autophagie ou l'apoptose (Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

Néanmoins, si les systèmes antioxydants de détoxification ne parviennent pas à maintenir des niveaux de ROS tolérés bas, des niveaux excessifs de ROS peuvent être nocifs et provoquer un état de stress oxydant.

### **I.3. Conséquences biologiques du stress oxydant**

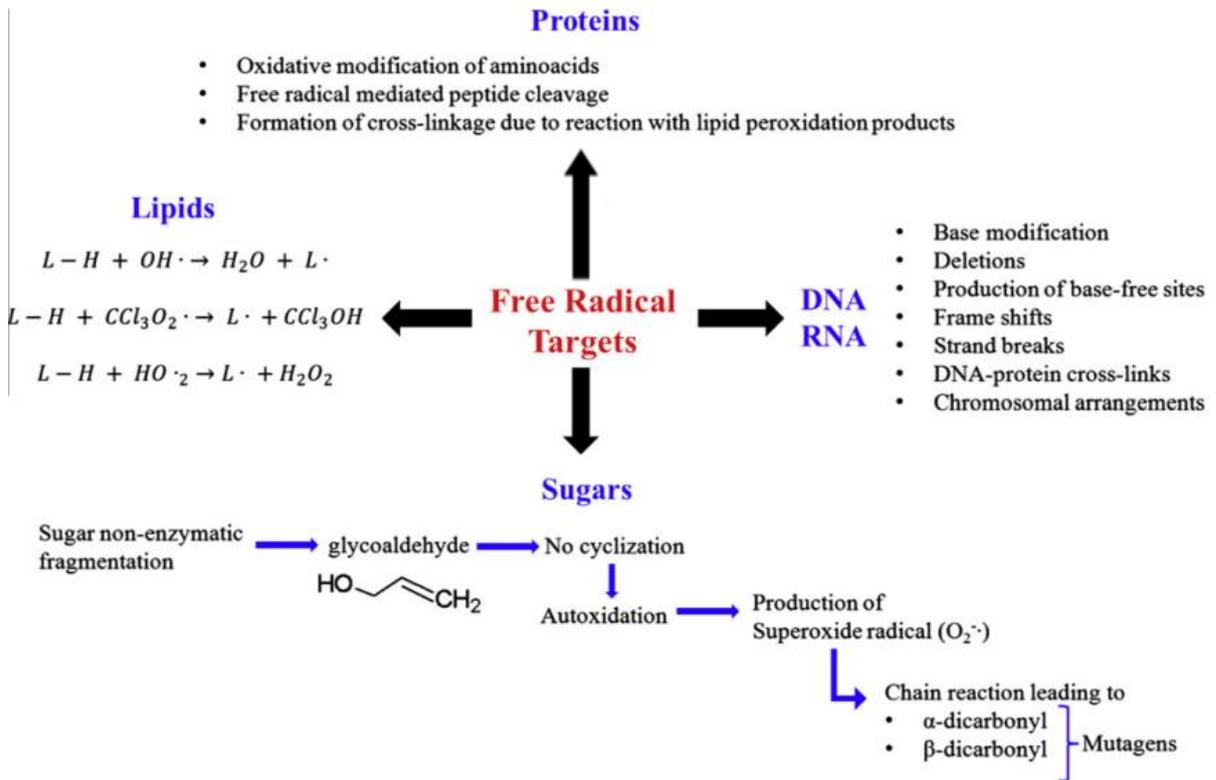
La production excessive de radicaux libres conduit à des dommages cellulaires et tissulaires souvent irréversibles. Les molécules biologiques touchées sont les acides nucléiques, les lipides, les protéines, et les glucides (figure 1).

#### **I.3.1. Oxydation de l'ADN**

Les ROS peuvent endommager les acides nucléiques par oxydation. L'ADN mitochondrial est plus vulnérable à l'attaque des ROS que l'ADN nucléaire, car il est situé à proximité du lieu de production des ROS. Le radical  $\text{OH}^\bullet$  peut réagir directement avec tous les composants de l'ADN, tels que les bases de purine et de pyrimidine et le squelette du désoxyribose et provoque un certain nombre d'altérations, notamment des ruptures de l'ADN à un ou deux brins. Le radical  $\text{OH}^\bullet$  peut arracher des atomes d'hydrogène pour produire des bases puriques et pyrimidine modifiées et des liaisons croisées ADN-protéine (Phaniendra *et al.*, 2015).

#### **I.3.2. Peroxydation lipidique**

Les lipides membranaires, en particulier les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides, sont les plus sensibles à l'oxydation par les ROS. La peroxydation des lipides est une réaction d'oxydation en chaîne où plusieurs molécules de lipide (LH) sont oxydées. Elle est initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène, par le radical hydroxyle, à partir d'un groupe méthylène entraînant la formation d'un lipide ayant un atome de carbone ( $^\bullet\text{CH}$ ) instable. Le lipide radical ( $^\bullet\text{CH}$ ) ainsi formé est stabilisé par réarrangement moléculaire pour produire un diène conjugué, qui peut ensuite réagir avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde ( $\text{LOO}^\bullet$ ). En phase de propagation, le radical peroxyde formé enlève



**Figure 1.** Cibles moléculaires des radicaux libres (Carocho et Ferreira, 2013).

l'hydrogène d'une autre molécule lipidique pour donner un nouveau radical lipide ( $\cdot CH$ ). Ceci permettra à l'oxydation en chaine de se poursuivre éternellement sauf en cas d'interruption par des antioxydants (Kalyanaraman, 2013). La peroxydation des lipides dans les membranes biologiques est impliquée à la fois dans l'apparition et le développement de la plupart des maladies dégénératives (Pratt *et al.*, 2011).

### I.3.3. Oxydation des protéines

Les ROS peuvent directement attaquer le squelette d'une protéine pour provoquer sa fragmentation ce qui conduit à des changements conformationnels dans la structure secondaire et tertiaire de la protéine. Les groupements disulfure, dityrosine et autres ponts intermoléculaires induits par l'oxydation entraînent également des changements qui peuvent conduire à l'agrégation, la polymérisation ou même au mauvais repliement et au déploiement de la protéine. Ces changements peuvent mener à une perte de fonctions et rendent les protéines susceptibles à la protéolyse cellulaire (Zhang *et al.*, 2013 ; Pisoschi et Pop, 2015). Les protéines touchées peuvent être des enzymes, des composants du cytosquelette, des protéines membranaires ou autres (Salvi *et al.*, 2001).

Les principales modifications oxydatives des protéines prennent place sur les chaînes latérales des acides aminés, qui incluent l'oxydation des thiols, l'hydroxylation des cycles aromatique et la formation de groupes carbonyles. Les chaînes latérales d'acides aminés qui contiennent des atomes de soufre réactifs, notamment la cystéine et la méthionine sont les plus sensibles à l'oxydation (Zhang *et al.*, 2013).

#### **I.3.4. Oxydation des glucides**

La liaison de monosaccharides à des groupes amines de protéines (glycation), donne naissance à des composants complexes appelés "produits de glycation avancés" (AGE), qui modifient la structure et les fonctions des protéines et participent à des complications à long terme pour le diabète (Gillery, 2001).

La glycation et le stress oxydatif sont étroitement liés. La formation de radicaux libres d'oxygène lors de la glycation précoce pourrait contribuer aux dommages liés à la glycoxydation. Au cours des étapes initiales de la glycosylation non enzymatique, la fragmentation du sucre produit des espèces à chaîne courte telles que le glycoaldéhyde, dont la chaîne est trop courte pour être cyclisée et qui est donc sujet à l'autoxydation. Le radical superoxyde sert d'initiateur et de propagateur de cette auto-oxydation. La réaction en chaîne résultante propagée par ce radical peut former des  $\alpha$  et  $\beta$ -dicarboxyles, qui sont des mutagènes bien connus (Carocho et Ferreira, 2013).

#### **I.4. Antioxydants**

Un antioxydant est une molécule suffisamment stable qui peut interagir en toute sécurité avec les radicaux libres pour les neutraliser. Ceci permet de terminer la réaction en chaîne avant que des molécules vitales ne soient endommagées, prévenant ainsi les dommages cellulaires. L'organisme utilise un ensemble d'antioxydants endogènes et exogènes qui assurent sa protection contre les radicaux libres et leurs effets délétères (Lobo *et al.*, 2010).

Les antioxydants endogènes comportent des enzymes antioxydantes, représentées principalement par la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et les glutathion peroxydase et réductase (GPX et GR), en plus des thioredoxines, et des peroxiredoxines (Birben *et al.*, 2012). Ces enzymes sont très performantes dans la détoxification des radicaux libres et des ROS. En plus des enzymes, l'organisme dispose d'autres molécules contribuant à la défense antioxydante et qui peuvent être soit des produits de synthèse (glutathion, histidine dipeptide), des produits issus du métabolisme cellulaire (acide urique), ou des protéines telles que la ferritine, la ceruloplasmine et l'albumine (Martinez-Cayuela, 1995 ; Kohen et Nyska, 2002 ; Birben *et al.*, 2012).

Les antioxydants exogènes comprennent une variété de composés structurellement différents et connus pour leurs propriétés antioxydantes. Ces puissants antioxydants sont apportés par l'alimentation et sont trouvés dans les fruits, les légumes, les plantes médicinales et les épices (Huang *et al.*, 2018). Les membres de cette catégorie d'antioxydants tel que les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène), les vitamines (acide ascorbique,  $\alpha$ -Tocopherol), les polyphénols, (flavonoïdes, Acides phénoliques et tanins), ont démontré leur efficacité en tant qu'extincteurs d'oxygène singulet et triplet, anti-radicaux libres, des scavengers, des décomposeurs de peroxydes et des inhibiteurs d'enzymes (Nema *et al.*, 2009).

### **I.5. Stress oxydant et pathologies**

La production excessive des ROS et l'incapacité des systèmes anti-oxydants à la contrebalancée est liée au développement de plusieurs pathologies telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, les accidents vasculaires cérébraux, l'arthrose, la sclérose latérale amyotrophique et les troubles neurodégénératifs (figure 2). Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas encore bien compris. Cependant, il est de plus en plus évident qu'il s'agit plutôt d'une association que d'un rôle causal des ROS avec la plupart des maladies (Phaniendra *et al.*, 2015).

### **I.6. Relation stress oxydant et inflammation**

Au cours des pathologies inflammatoires, les leucocytes phagocytaires (neutrophiles, macrophages et éosinophiles) produisent des quantités importantes d'espèces réactives de l'oxygène pour neutraliser les agents infectieux. Toutefois, ces métabolites sont à l'origine des lésions cellulaires et tissulaires caractéristiques des maladies inflammatoires.

En plus de l'effet stimulateur de l'inflammation par les lésions induites par les ROS, ces dernières peuvent également initier et/ou amplifier l'inflammation via la régulation à la hausse de plusieurs gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, tels que ceux codant pour les cytokines pro-inflammatoires et les molécules d'adhérence. Cela est médié par l'activation de certains facteurs de transcription, tels que le facteur de transcription nucléaire  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), le facteur inductible par l'hypoxie (HIF) ou la protéine activatrice 1 (AP-1) chez de nombreux types cellulaires (cellules épithéliales bronchiques, cellules endothéliales, neutrophiles et mastocytes) (Sagai et Bocci, 2011 ; Sesti *et al.*, 2012). La diminution par le stress oxydant des taux cellulaires de GSH, un inhibiteur de NF- $\kappa B$  et de AP-1, est l'une des voies qui expliquent la relation indissociable entre les ROS et l'inflammation (Huet et Duranteau, 2008).



**Figure 2.** Pathologies associées au stress oxydant (Pahari *et al.*, 2016).

## II. Inflammation

L'inflammation est une réponse physiologique des tissus vascularisés qui survient suite à une agression qui entraîne une altération de l'homéostasie tissulaire. Elle peut être déclenchée par une infection microbienne, une lésion tissulaire ou autres conditions agressives (Khanna *et al.*, 2014). Elle consiste en un ensemble de mécanismes moléculaires et cellulaires par les quelles l'organisme vise à reconnaître et détruire rapidement les agents agresseurs, éliminer les tissus endommagés et retrouver de nouveau son équilibre en promouvant la réparation tissulaire (Ahmed, 2011).

La réaction inflammatoires peut jouer un double rôle: elle est indispensable à la défense de l'organisme, et son éventuelle insuffisance est préjudiciable à celui-ci; mais sa mise en jeu d'une manière trop importants ou inappropriés à la situation entraîne des

phénomènes pathologiques qui peuvent être très nocifs à l'organisme . Cela explique l'importance de la régulation de l'inflammation (Galanaud et Emilli, 2001).

L'inflammation normale, dite inflammation aigue, est rapide et spontanément résolutive, mais si la résolution de l'inflammation échoue pour une raison quelconque, l'inflammation devient alors chronique (Saibabu *et al.*, 2015).

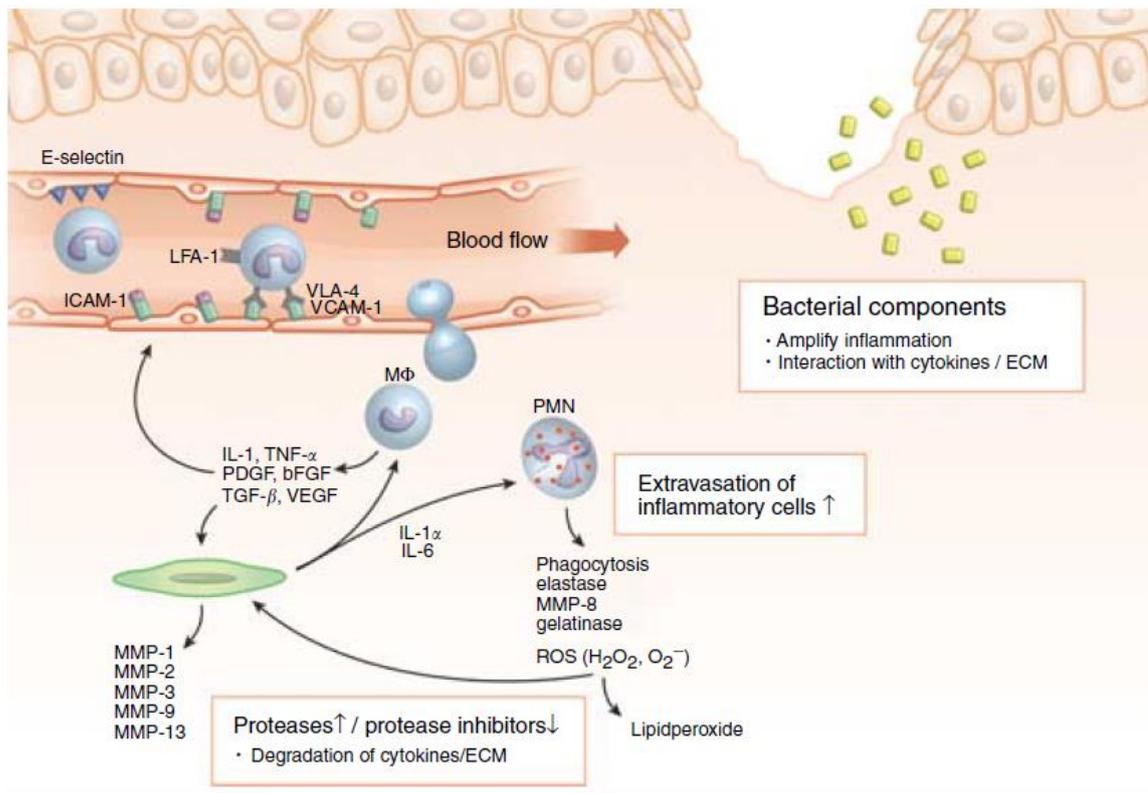
## **II.1. Inflammation aigue**

L'inflammation aigue est considérée comme une partie de l'immunité innée qui constitue la première ligne de défense de l'hôte contre les organismes envahisseurs (Ahmed, 2011). Elle s'installe rapidement et dure de quelques heures à plusieurs jours. Elle se caractérise par l'augmentation du flux sanguin et de la perméabilité vasculaire avec une accumulation accrue de fluides, de médiateurs inflammatoires et de leucocytes. Ces phénomènes se traduisent par une un œdème, une rougeur et une chaleur. Ils peuvent également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Feghali et Wright, 1997 ; Botting et Botting, 2000).

L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases : une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des micro-organismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduit à la restauration des tissus (figure 3).

### **II. 1.1. Phase vasculaire**

Le premier événement de la réaction inflammatoire est basé sur la réaction des cellules résidentes du tissu endommagé. Parmi ces cellules, les mastocytes et les macrophages jouent un rôle déterminant pour alerter le corps suite à une lésion tissulaire en libérant des médiateurs tels que l'oxyde nitrique (NO), l'histamine, les kinines, les cytokines (IL-1, IL-6 et IL-8) ou les prostaglandines (Vergnolle, 2003). La cascade de coagulation et l'activation du système du complément interviennent également dans cette phase par la génération de divers médiateurs doués d'activités vasodilatatrice et chimioattractante comme le facteur XII, la fibrine, la bradykinine, C3a et C5a (Fauve et Hevin, 1998).



**Figure 3.** Etapes de l'inflammation aigue (Eming *et al.*, 2007).

De leur part, les plaquettes activées, suite à une lésion tissulaire touchant ou pas les veinules ou les artérioles, produisent du thromboxane A2 aux propriétés agrégantes et vasoconstrictrices puissantes et favorisent la libération de médiateurs comme la sérotonine et l'histamine. La libération de ces facteurs vasoactifs entraîne une vasodilatation et augmente la perméabilité vasculaire et par conséquent l'exsudation plasmatique (Buckley *et al.*, 2014).

Une autre voie de déclenchement de la phase vasculaire est celle médiée par la substance P et le peptide lié au gène de la calcitonine, sécrétée par Les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine. Ces deux facteurs induisent, en plus de l'activation des mastocytes, une vasodilatation et une exsudation plasmatique en agissant sur les cellules endothéliales et les muscles lisses des vaisseaux sanguins (Birklein et Schmelz, 2008 ; Börzsei *et al.*, 2008).

La vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire induites par les événements précédents conduisent à une tuméfaction locale accompagnée de rougeur et de chaleur caractéristiques de l'œdème inflammatoire. La distension des tissus provoque une hyper-pression sur les terminaisons nerveuse locales, ce qui explique les sensations de douleur (Weill *et al.*, 2003).

### **II.1.2. La phase cellulaire**

Attirés par les chimioattractants de l'exsudat et ceux libérés au niveau du site enflammé, les leucocytes circulants sont recrutés vers le foyer lésionnel. Les phagocytes, principalement les polynucléaires neutrophiles et les monocytes, commencent d'abord à rouler sur les surfaces endothéliales de la veine. Ils adhèrent ensuite à l'endothélium pour pouvoir migrer à travers la barrière endothéliale. Tous ces phénomènes de roulement, d'adhérence et de passage à travers les cellules endothéliales sont régulés par plusieurs molécules d'adhésion exprimées à la fois par l'endothélium et les leucocytes, notamment les intégrines et les sélectines (Vergnolle *et al*, 2002).

Du point de vue chronologique, les neutrophiles sont les premiers à rejoindre le foyer inflammatoire, suivis plus tard par les monocytes qui achèvent leur différenciation en macrophages. Ces deux types cellulaires phagocytent les agents étrangers et/ou les débris cellulaires. Des protéases (collagénase, élastase) et des radicaux libres dérivés du métabolisme de l'oxygène et du monoxyde d'azote sont produits au cours de la phagocytose. Ces agents destinés à éliminer les microorganismes pathogènes et les débris tissulaires peuvent aussi endommager les tissus sains. Ainsi, de telles atteintes peuvent accompagner les réactions inflammatoires entièrement normales et bénéfiques, et les dommages sont plus importants, d'autant plus que la réaction est plus forte (Fauve et Hevin, 1998 ; kumar *et al.*, 2013).

### **II.1.3. La phase de résolution**

L'inflammation est normalement un processus contrôlé et spontanément résolutif. La résolution de l'inflammation est dominée par de nombreux médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10, le TGF $\beta$  et les glucocorticoïdes, et implique également le recrutement de monocytes pour l'élimination des débris cellulaires (Serhan and Savill, 2005). Une fois les agents pathogènes éliminés, les neutrophiles subissent une apoptose constitutive. Ce processus permet leur reconnaissance et leur élimination par les macrophages et limite leurs actions potentiellement néfastes (El Kebir et Filep, 2013 ; Kumar *et al.*, 2013).

La phagocytose des neutrophiles par les macrophages induit la polarisation des macrophages d'un phénotype pro-inflammatoire (M1) à phénotype pro-résolution (M2). Les macrophages M2 sécrètent des médiateurs, tels que l'IL-10 et le TGF $\beta$ , qui interviennent dans la résolution et la réparation des tissus (El Kebir et Filep 2013).

La résolution de l'inflammation nécessite aussi l'élimination des médiateurs chimiques locaux. L'expression de récepteur des C-C chimiokine de type 5 (CCR5), aussi connu sous le nom de CD195, sur les cellules polymorphonucléaires humaines apoptotiques, leur permet de

séquestrer les cytokines pro-inflammatoires. L'expression de ses récepteurs est inhibée par les stimuli pro-inflammatoires, notamment le facteur de nécrose tumorale, et augmentée par les médiateurs lipidiques qui favorisent la résolution, notamment la lipoxine A4, la résolvine E1 et la protectine D1 (Ariel *et al.*, 2006).

## **II. 2. Inflammation chronique**

La réponse inflammatoire prend fin dès que le danger potentiel est éliminé, mais ceci n'est pas toujours le cas. La persistance de l'agent causal peut avoir plusieurs raisons dont, l'incapacité de l'élimination du microorganisme pathogène, la réaction immunitaire contre un antigène de soit ou dans le cas d'hypersensibilité vis-à-vis d'antigènes inoffensifs normalement présents dans l'entourage de l'hôte. L'inflammation devient alors chronique et sa durée s'étale sur des mois ou des années, voir se prolonger tout au long de la vie de l'individu (Fauve et Hevin, 1998 ; Kumar *et al.*, 2013). L'inflammation chronique est un processus dans lequel les dommages cellulaires et les tentatives de réparation tissulaire se produisent simultanément. La réponse exsudative est généralement moins prononcée, même si elle est toujours présente. Le recrutement des cellules inflammatoire est accru et peut s'accompagner d'une prolifération cellulaire locale (Kumar et Wakefield, 2015).

l'inflammation chronique se caractérise par l'infiltration des cellules inflammatoires primaires telles que les macrophages, les lymphocytes et les plasmocytes dans le tissu, et qui produisent des cytokines inflammatoires, des facteurs de croissance et des enzymes, contribuant ainsi à la progression des lésions tissulaires et à la réparation secondaire, y compris la fibrose et la formation de granulomes (Fauve et Hevin, 1998 ; Weill *et al.*, 2003). La présence des polynucléaires éosinophiles est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires (Dombrowicz et Capron, 2007).

## **II.3. Inflammation et pathologies**

Le lien entre l'inflammation et diverses maladies telles que le cancer, les troubles métaboliques, le diabète de type II, l'arthrite, les maladies auto-immunes, les maladies neurologiques, les maladies pulmonaires et les complications cardiovasculaires est bien connu (Saibabu *et al.*, 2015). Environ 15% des cancers chez l'homme sont associés à une infection chronique et à une inflammation. Les maladies inflammatoires de l'intestin en font un bon exemple (Chen *et al.*, 2018). La détection des facteurs de transcriptions tels que le facteur nucléaire kappa-B (NF- $\kappa$ B), STAT et leurs produits géniques tels que la COX-2, les cytokines, les chimiokines et les récepteurs des chimiokines dans un grand nombre de

maladies a élucidé le rôle important de l'inflammation dans les maladies chroniques (Laveti *et al.*, 2013). La production continue de cytokines et de chimiokines favorise le maintien des cellules inflammatoires pleinement actives sur le site inflammatoire. La destruction tissulaire ainsi résultante persiste alors (Lowe *et al.*, 2011).

## **II.4. Traitement de l'inflammation**

### **II.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) représentent un groupe de médicaments ayant d'importantes applications thérapeutiques. Ils ont en commun la capacité de restreindre l'activité de la cyclooxygénase (COX) et donc de bloquer la biosynthèse des prostaglandines.

En plus de leur activité anti-inflammatoire, les AINS ont des propriétés antipyrétiques et analgésiques. Cependant, les bienfaits thérapeutiques des AINS sont limités par leurs effets indésirables graves, principalement digestifs (ulcères gastroduodénaux) et à un moindre degré rénaux (Lahmidani *et al.*, 2012). L'impossibilité de dissocier les effets thérapeutiques des AINS de leurs effets indésirables s'explique par leur inhibition non sélective des cyclo-oxygénase 1 et 2 (COX1, COX2) à la fois (Blain *et al.*, 2000). La COX-1 présente de façon constitutive dans la plupart des tissus humains a pour rôle la régulation d'un nombre de processus physiologiques dont la maintenance de l'intégrité de la muqueuse gastrique, la fonction rénale, et l'agrégation plaquettaire. L'inhibition de la COX 1 se trouve derrière les effets secondaires majeurs des AINS (Hawkey, 2001 ; Vonkeman *et al.*, 2008).

### **II.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens**

Les glucocorticoïdes sont un groupe d'hormones stéroïdiennes libérées par le cortex surrénalien après l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien par des stimuli inflammatoires liés au stress. Ils possèdent de puissants effets anti-inflammatoires médiés par les récepteurs cytosoliques des glucocorticoïdes (GRs), à travers lesquelles ils interagissent avec les facteurs de transcription NF- $\kappa$ b et AP-1 et inhibent ainsi l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Kumar *et al.*, 2013b). Les glucocorticoïdes suppriment également la libération des prostaglandines, des leucotriènes et du NO. De plus, ils inhibent l'expression des molécules d'adhésion, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T par des mécanismes multiples (Cruz-Topete et Cidlowski, 2015). Comme ils amplifient la transcription des gènes codants pour d'autres cytokines anti-inflammatoires lymphocytaires, tel que l'IL-10 et le TGF $\beta$ . Les glucocorticoïdes peuvent ainsi agir sur toutes les phases de

l'inflammation qu'elle soit aiguë ou chronique (Visser *et al.*, 1998).

Malheureusement, Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie. Ils ont l'inconvénient de réduire la défense de l'organisme et de provoquer des troubles qui peuvent être aigus (hypertension artérielle, dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes, ulcère gastroduodéal...etc.) ou chroniques tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003 ; Strehl *et al.*, 2011 ; Cruz-Topete et Cidlowski, 2015).

### **II.4.3. Anti-inflammatoires naturels**

Traditionnellement, l'homme a utilisé des plantes médicinales ayant de bons effets thérapeutiques depuis des milliers d'années dans le cadre de son régime alimentaire ou comme substances thérapeutiques. Les effets thérapeutiques de ces plantes sont dus à leur richesse en métabolites secondaires bioactifs, tels que les polyphénols, les stérols, les alcaloïdes, les coumarines et les terpènes.

Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes sont doués de propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes considérables (Pérez-Cano and Castell, 2016). Les flavonoïdes des agrumes, du thé et du raisin présentent la capacité de réduire l'inflammation d'une manière similaire à l'aspirine en bloquant les voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase et éventuellement par d'autres mécanismes (Medilton *et al.*, 2000). Certains flavonoïdes tels que le kaempférol, la génistéine, la quercétine et la daidzéine répriment l'activation des deux facteurs de transcription des NO synthase inductibles, voir STAT-1 et NF- $\kappa$ b ; tandis que d'autres composés tels que l'isorhamnetin, la naringénine, les flavones et la pleargonidine ont une bonne activité contre le NF- $\kappa$ b dans les macrophages activés (Hamalainen *et al.*, 2007). Plusieurs composés tels que la quercétine, la génistéine et la théophylline (alcaloïde) ont une activité antagoniste du TNF- $\alpha$ . La génistéine et la quercétine inhibe la production de TNF- $\alpha$ , alors que la théophylline inhibe son activité dans les cellules THP-1 (Nair *et al.*, 2006 ; Rosillo *et al.*, 2012 ; Suboj *et al.*, 2012). La curcumine agit comme un agent anti-inflammatoire qui peut supprimer l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ b , réguler négativement l'expression de COX2, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 et IL-8 et inhiber l'expression de la 5-lipooxygénase (5-LOX) pro-inflammatoire. L'efficacité de la curcumine a été démontrée avec de nombreuses maladies inflammatoires à savoir l'arthrite, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies cardiovasculaires (Kumar *et al.*, 2013b).

Les proanthocyanidines, y compris les tannins catéchiques, sont également associées à

un bon nombre d'activités biologiques dont l'activité anti-inflammatoire, anti-asthmatique, anticancéreuse, antimicrobienne, anti-allergique et antihypertenseur. Les effets bénéfiques des proanthocyanidines sur la santé humaine sont principalement attribués à leur puissante activité anti-oxydante. Ces composés sont des antagonistes de récepteurs hormonaux particuliers et des inhibiteurs d'enzymes particulières telles que les cyclooxygénase (Diouf *et al.*, 2009; Fawole *et al.*, 2009).

Les gallotannins exercent divers effets biologiques allant des propriétés anti-inflammatoires aux propriétés anticancéreuses et antivirales. Les mécanismes des effets anti-inflammatoires des tanins comprennent le balayage des radicaux et l'inhibition de l'expression de médiateurs inflammatoires, tels que certaines cytokines, l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la COX-2 (Mohammed,*et al.*, 2014)

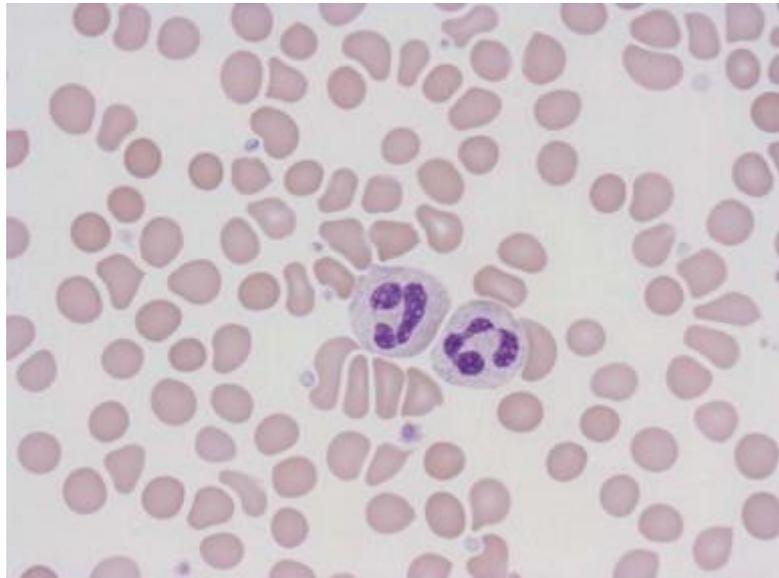
La cepharanthine, la cycleanine, et l'isotetrandrine sont des alcaloïdes de la plante *Stephania cephararantha* qui suppriment la libération de l'histamine et la production de l'oxyde nitrique in vitro. La cepharanthine inhibe fortement la réplication du virus du SIDA dans une lignée de monocytes chroniquement infectée. De plus, il supprime la production des cytokines (Sato *et al.*, 2003).

D'autre part, les huiles essentielles et leurs terpenoides constitutifs issus de nombreuses espèces du genre *Eucalyptus* (Myrtaceae), de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), des feuilles de *Lippia sidoides* (Verbenaceae), de *Lippia gracilis Schauer* (Verbenaceae) et de *Zizyphus jujube* possèdent des effets analgésiques et anti-inflammatoires bien établis (Mohammed *et al.*, 2014).

### III. Neutrophile

Les neutrophiles, également connus sous le nom de polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs), sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation. Ils sont produits quotidiennement par la moelle osseuse à raison de  $10^{11}$  cellules par jour. Le noyau multi-lobé des neutrophiles (figure 4) facilite leur déplacement à travers les interstices étroits formés entre les cellules endothéliales ou à l'intérieur de pores de la matrice extracellulaire (Selder *et al.*, 2017). Tout comme les autres granulocytes, les neutrophiles contiennent plusieurs types de granules dans leur cytoplasme renfermant des protéines lytiques et des substances microbicides. Selon leur contenu, ces granules sont classées en : granules azurophiles, granules spécifiques, granules à gélatinases et vésicules sécrétoires (Boreegard, 2010).

Les neutrophiles représentent la première ligne de défense de l'immunité innée. Ils sont les premiers leucocytes à migrer, en très grand nombre, vers les sites infectés ou enflammés. Ils capturent et détruisent les micro-organismes envahisseurs, par phagocytose et dégradation intracellulaire, libération de granules et formation de pièges extracellulaires de neutrophiles après la détection d'agents pathogènes (Rosales, 2018). Les neutrophiles participent également dans la persistance de l'inflammation et la progression des lésions tissulaires. Ils ont un potentiel énorme d'infliger directement des dommages aux tissus, aux os et au cartilage par la sécrétion de protéases et d'espèces toxiques de l'oxygène, ainsi que de soutenir l'inflammation par la présentation d'antigènes et la sécrétion de cytokines, de chimiokines, de prostaglandines et de leucotriènes (wright, 2010).



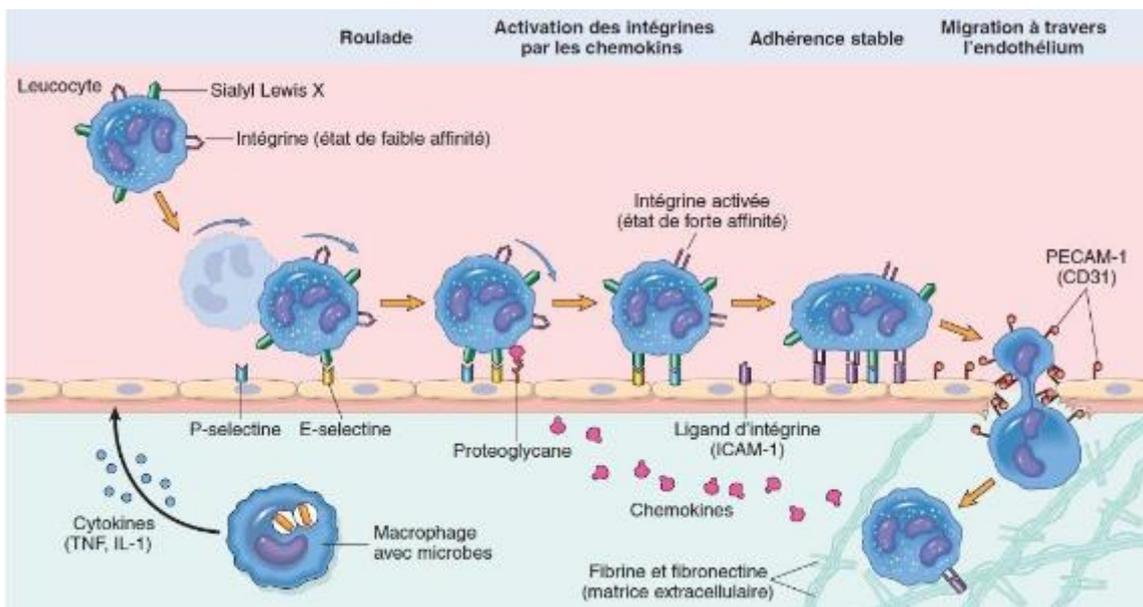
**Figure 4.** Photographie sous microscope photonique du neutrophile humain (Wickramasinghe et Erber, 2011).

### **III.1. Fonctions du neutrophile**

#### **III.1.1. Migration vers le site de l'inflammation**

Les neutrophiles du sang peuvent être mobilisés vers des sites d'infection ou de l'inflammation par le biais d'un processus appelé cascade d'adhésion leucocytaire et qui se déroule en une série d'évènements hautement régulés. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins proches du site affecté sont activées et expriment des récepteurs d'adhésion tels que les sélectines E et P. Ces récepteurs lient les ligands glycoprotéiques des sélectines constitutivement présents sur les neutrophiles. Ces interactions, de faible affinité, induisent le roulement du neutrophile le long de l'endothélium. Ensuite, le neutrophile est

activé via des récepteurs couplés à la protéine G par des chimiokines, qui induisent un état d'expression et d'affinité élevé des intégrines  $\beta 2$ . La liaison des intégrines à leurs ligands, tels que la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et ICAM-2 sur les cellules endothéliales, provoque une adhésion ferme du neutrophile. Ensuite, le neutrophile transmigre dans les tissus périphériques (figure 5). Une fois les neutrophiles dans les tissus périphériques, ils suivent des gradients de chimioattractants tels que le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) et l'anaphylatoxine C5a pour compléter leurs fonctions (Rosales, 2018).



**Figure 5.** Mécanisme de migration trans-endothéliale du neutrophile (Kumar *et al.*, 2014).

### III.1.2. Phagocytose de l'agent pathogène

Une fois arrivés aux sites de l'infection, les neutrophiles éliminent les agents infectieux par phagocytose suivie d'une mobilisation intracellulaire d'agents microbicides au niveau du phagosome formé (Roberts et Hallett, 2019). Le processus de phagocytose peut être divisé en trois phases: i) la fixation de la particule opsonisée lors de la reconnaissance par des récepteurs spécifiques, ii) l'émission de pseudopodes autour de la particule qui est encore exposée à l'environnement, et iii) l'achèvement de l'engloutissement de la particule entraînant la formation d'un phagosome, qui devient un compartiment membranaire à l'intérieur de la cellule. Les prochaines étapes impliquent la mobilisation et la fusion du phagosome avec différents types de granules, ce qui entraîne la libération du contenu en granules servant à la destruction du microorganisme (Kessal *et al.*, 2014). Tout comme la myéloperoxydase

(MPO), l'élastase qui se trouve dans les granules primaires des neutrophiles au repos est transféré au phagosome (Hurst, 2012). En même temps, une forte explosion oxydative est initiée dans le phagosome par le complexe enzymatique NADPH oxydase suite à une stimulation de récepteurs spécifiques à la surface des cellules, conduisant à la génération de ROS hautement toxiques. Avec le contenu granulaire, les ROS jouent un rôle important dans la destruction bactérienne (Kessal *et al.*, 2014).

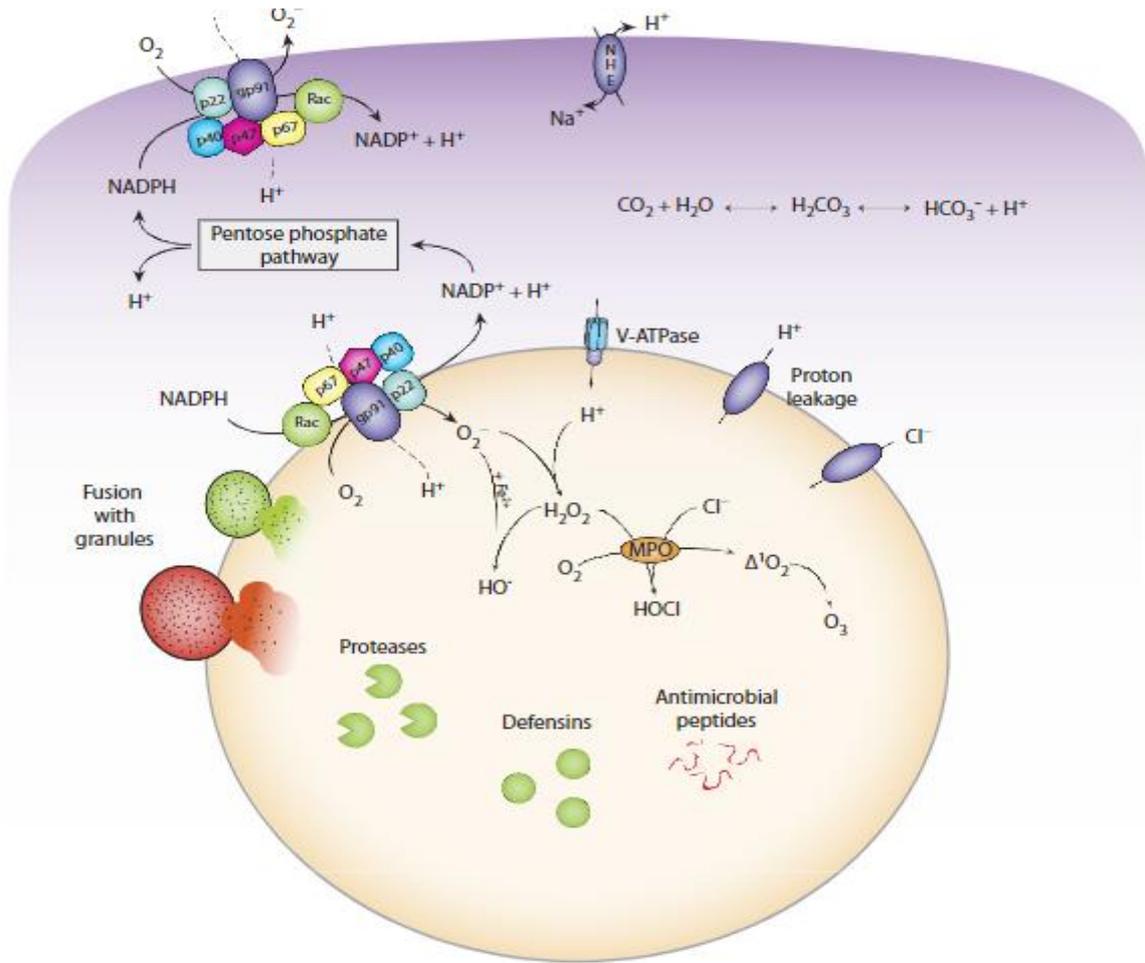
Les neutrophiles peuvent lier et ingérer les microorganismes par le biais de récepteurs de surface spécifiques. Certains de ces récepteurs reconnaissent les lipopolysaccharides et les polysaccharides des pathogènes, d'autres reconnaissent des protéines du soit, appelées opsonine, qui se fixent sur les microorganismes envahisseurs les rendant ainsi, une cible pour la phagocytose. Les plus importantes des opsonines sont les anticorps de type IgG et les fragments du complément (C3b), reconnus par les récepteurs FcγRII ou FcγRIII ; et RC1 ou RC3 respectivement (Amulic *et al.*, 2012 ; Kumar *et al.*, 2013b).

L'émission de pseudopodes et l'engloutissement du pathogène, qui suivent l'interaction des opsonines avec leur récepteurs, sont initiés par une série d'évènements de signalisation qui vont induire une réorganisation de la membrane plasmique et un remodelage du cytosquelette d'actine. Au point de contact, se forme une dépression de la membrane (cupule phagocytaire). Ensuite, la membrane entoure la particule cible puis se ferme à l'extrémité distale, formant le phagosome (Rosales et Uribe-Querol, 2017). Une fois l'agent pathogène internalisé, le neutrophile mobilise son système bactéricide pour assurer sa destruction (figure 6).

### **III.1.3. Dégranulation**

Dans les conditions normales, Les neutrophiles se trouvent dans la circulation sanguine à l'état de repos, ce qui garantit que leur contenu intracellulaire toxique ne soit pas libéré accidentellement pour endommager les tissus de l'hôte. Les neutrophiles activés sont mobilisés sur le site de l'infection ou de l'inflammation, où ils utilisent leur arsenal de substances bactéricides stockés dans les différents types de granules pour neutraliser les pathogènes (Wright, 2010).

Les neutrophiles contiennent au moins quatre types de granules différents: i) les granules primaires (azurophiles); ii) les granules secondaires (granules spécifiques); iii) les granules tertiaires; et vi) les vésicules de sécrétion. Les granules primaires constituent le principal site de stockage des médiateurs les plus toxiques, notamment l'élastase, la myéloperoxydase, les cathepsines et les défensines. Les granules secondaires et tertiaires



**Figure 6.** Destruction des pathogènes au sein du phagosome par mobilisation de systèmes bactéricides (Nordenfelt et Tapper, 2011).

contiennent respectivement la lactoferrine et la métalloprotéase matricielle 9 (gélatinase B). Les vésicules de sécrétion des neutrophiles humains contiennent de l'albumine du sérum humain (Lacy, 2006).

Lorsque les récepteurs sont stimulés par un sécrétagogue, les granules se déplacent vers la membrane phagosomale ou plasmatique, où ils se fixent et fusionnent avec la membrane pour libérer leur contenu par exocytose. L'exocytose est supposée se dérouler en quatre étapes distinctes. La première étape est le recrutement de granules du cytoplasme à la membrane cible, qui dépend du remodelage du cytosquelette d'actine et de l'assemblage des microtubules. Une structure de pores de fusion réversible se développe entre le granule et la membrane cible. La fusion des granules se produit par l'expansion des pores de fusion, conduisant à la fusion complète du granule avec la membrane cible pour libérer le contenu granulaire (lacy, 2006).

L'augmentation de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  suffit à elle seule à induire la libération de nombreux types de granules chez les neutrophiles (figure 7). Le calcium

favorise la dégranulation du neutrophile par son action sur les interactions entre les SNAP (Soluble NSF attachment protein) et les SNARE (SNAP receptor proteins) (Fauschou et Borregaard, 2003). La libération des granules obéit à une hiérarchie qui dépend de la concentration de  $Ca^{2+}$ . L'ordre de libération est le suivant: vésicules de sécrétion, granules tertiaires, granules secondaires et enfin les granules primaires (Hafri *et al.*, 2005). De nombreux récepteurs de neutrophiles activent des niveaux élevés de  $Ca^{2+}$ , notamment les récepteurs couplés à la protéine G, tels que le récepteur du fMLP et les récepteurs de chimiokines (Lacy, 2006).

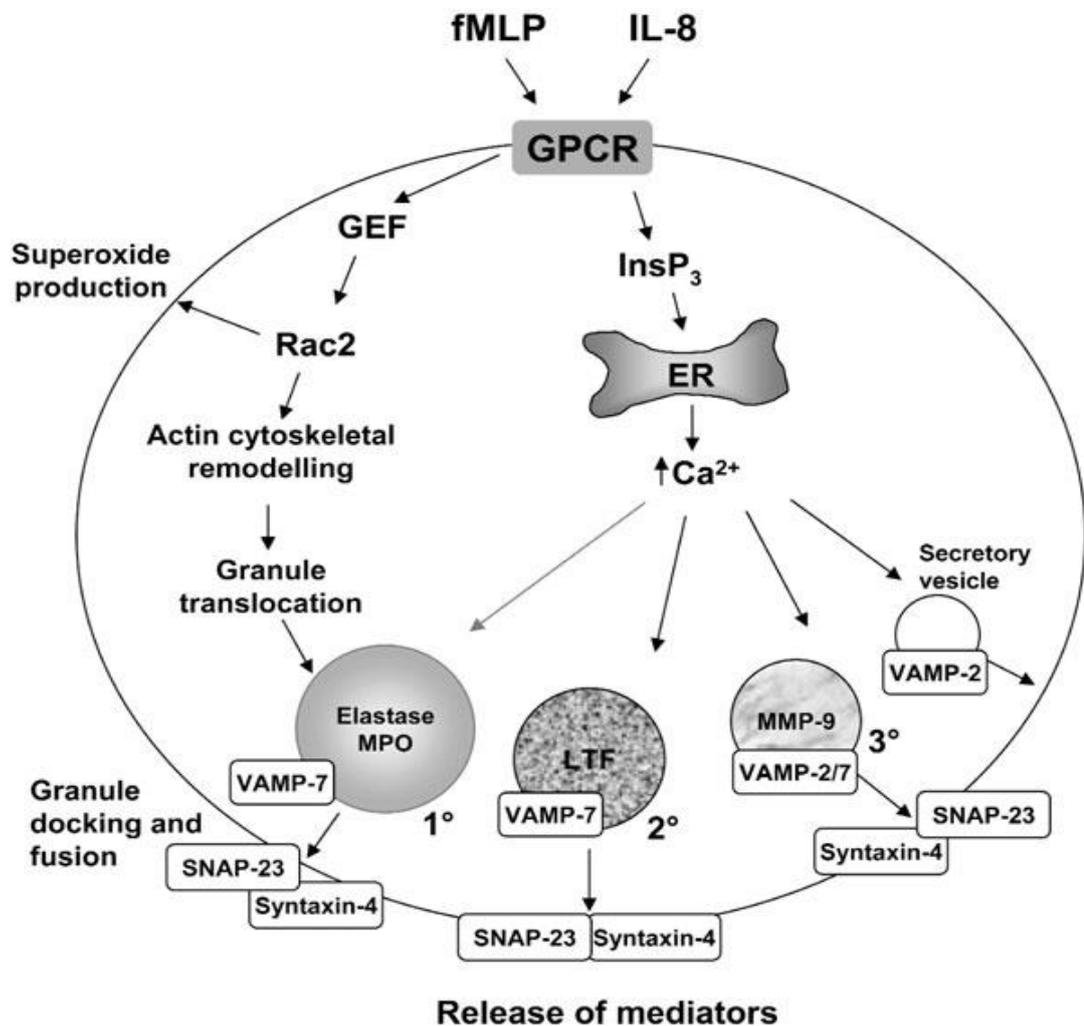


Figure 7. Mécanisme moléculaire de la dégranulation du neutrophile (Lacy, 2006).

### III.1.4. Flambée respiratoire

La flambée respiratoire est un phénomène au cours duquel les neutrophiles augmentent considérablement leur taux de consommation d'oxygène suite à leur exposition à certains stimuli tel que le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), le fMLP et l'ionomycine,

ou à des bactéries opsonisées. Ceci est accompagné par la métabolisation de grandes quantités de glucose à travers la voie des hexoses monophosphate. L'oxygène utilisé n'est pas destiné à la respiration mais plutôt à la production de puissants agents microbicides en aval d'une production initiale de superoxyde par la réduction de l'oxygène moléculaire. Le NADPH utilisé pour cette production est régénéré au cours de l'oxydation du glucose par la voie des hexoses monophosphate (Thomas, 2017).

Cette explosion respiratoire est générée par un complexe enzymatique, la NADPH oxydase, qui possède un noyau catalytique constitué de sous-unités gp91phox (CYBB) et p22phox (CYBB) liées à la membrane, et de composants cytosoliques p47phox (NCF1), p67phox (NCF2) et p40phox (NCF4). Enfin, un autre composant cytosolique, la petite protéine G Rac2 est également nécessaire pour une activation complète (Thomas, 2017).

## **IV. Plantes étudiées**

### **IV.1. *Pinus halepensis***

#### **IV.1.1. Description et classification botanique**

Le genre *Pinus* regroupe plus de 100 espèces appartenant à la famille des Pinacées, originaires et très répandues en Europe, en Afrique, en Asie et en Amérique (Molotkov et Patlaj, 1991). *Pinus halepensis* Mill., communément appelé Pin d'Alep (figure 8) est le plus largement répandu et le plus abondant parmi les pins méditerranéens. IL couvre près de 6,8 millions d'hectares de cette région, qui s'étendent de la Méditerranée occidentale (Espagne, Maroc), où il est le plus abondant, au Liban en passant par le sud de la France, l'Italie la Grèce, la Turquie, l'Algérie, la Tunisie et la Libye (Vennetier *et al.*, 2010 ; Sghaier et Ammari, 2013 ; Mauri *et al.*, 2016). Le nom de *P. halepensis* est dérivé de la ville d'Alep (Haleb) située sur la côte syrienne (Mauri *et al.*, 2016).

Le pin d'Alep est un arbre qui peut atteindre plus de 20 m d'hauteur. À maturité, le tronc a généralement un diamètre de 80 cm et peut atteindre 100 cm. Le tronc se divise en plusieurs branches formant une couronne largement conique en forme de dôme, s'aplatissant et s'ouvrant avec l'âge. Il se distingue facilement des autres espèces de pins par ses aiguilles d'un vert vif, de 6 à 12 cm de long et de moins de 1mm de diamètre. L'écorce apparaît écailleuse et grise avec un dessous rouge. Le pin d'Alep se reproduit uniquement par graines. Il est caractérisé par une forte production de cônes coniques pédonculés, qui restent fermés sur l'arbre pendant un an ou plus après la maturation de la graine pour s'ouvrir rapidement suite à des températures élevées. Leur couleur est grise à brun rougeâtre et leur longueur est



**Figure 8.** Photographie de *Pinus halepensis* de la région de Medjana (BBA).

comprise entre 5 et 12 cm. La taxonomie de *Pinus halepensis* selon est la suivante :

Classe : Coniferopsida

Ordre : Coniferales

Famille : Pinaceae

Genre : Pinus

Espèce: *Pinus halepensis* Miller, 1768 subsp. *Halepensis*

#### **IV.1.2. Usage traditionnel**

Différentes espèces du genre de Pinus sont utilisées à travers le bassin méditerranéen dans divers applications thérapeutiques. L'huile essentielle est utilisée pour traiter une variété de problèmes de peau et pour le traitement des plaies et des brûlures (Demirci *et al.*, 2015). Diverses parties du pin (écorce, aiguille, cône et résine) sont utilisées pour la cicatrisation des plaies et contre les maux d'estomac. Elles sont également utilisées comme anti-inflammatoire et comme antiseptique (Süntar *et al.*, 2012). La décoction des bourgeons, de l'écorce et des cônes matures ou jeunes ainsi que la poudre des résines et des cônes verts sont utilisés pour le soulagement de l'asthme, la bronchite et la toux (Kızılarşlan et Sevg, 2013).

#### **IV.1.3. Phytochimie et propriétés biologiques**

Les espèces du genre Pinus sont largement connues pour leurs propriétés médicinales associées à leur composition chimique. En effet, plusieurs études ont révélé la présence de métabolites secondaires douées d'activités biologiques intéressantes dans les différentes parties de *Pinus halepensis* et d'espèces apparentées du même genre.

Kouachi et Derouiche (2018) et Salim et ses collaborateurs (2019) ont rapporté la richesse des extraits de *P. halepensis* en composés phénoliques et en flavonoïdes. Abdalla et ses collaborateurs (2014) ont également révélé la présence de quantités considérables de proanthocyanidines et de gallotannins dans l'extrait aqueux de *Pinus halepensis*. Iravani et Zolfaghari (2011) ont rapporté que l'extrait de l'écorce de *Pinus pinaster* et *Pinus eldarica* est riche en catéchine, en taxifoline et en tanins procyanidiques. Kotroni et ses collaborateurs (2019) ont rapporté que l'extrait aqueux d'écorce de *P. halepensis* est riche en agents antioxydants comprenant principalement des procyanidines et des acides phénoliques. D'autre part, Karioti et ses collaborateurs ont rapporté la présence de catéchines et des tanins catéchiques dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Pinus pinaster*.

Fekih et ses collaborateurs (2014) ont rapporté que l'huile essentielle de *Pinus halepensis* de différentes régions de l'ouest algérien contient 65,5% de monoterpènes dont les principaux sont : myrcène (15,2% à 32,0%),  $\alpha$ -pinène (12,2% à 24,5%), E- $\beta$ -caryophyllène (7,0% à 17,1%), terpinolène (1,8% à 13,3%), 2-phényl éthyle isovalérate (4,8% à 10,9%), terpinène-4-ol (1,0% à 8,2%) et le sabinène (1,5% à 3%). Les huiles essentielles et les extraits d'écorce, d'aiguilles ou de cônes ont montré des activités antioxydantes, antivirales, analgésiques, cytotoxiques, anti-inflammatoires et/ou antimicrobiennes (Kotroni *et al.*, 2019).

L'extrait de l'écorce du pin maritime (*Pinus pinaster*) possède des effets antioxydants et anti-inflammatoires puissants (Becit *et al.*, 2017). Il contient entre 65% et 75% de procyanidines, composés de sous-unités de catéchine et d'épicatéchine avec différentes longueurs de chaîne. Les autres constituants sont les monomères polyphénoliques, les acides phénoliques ou cinnamiques et leurs glycosides (D'Andrea *et al.*, 2010). Plusieurs études antérieures ont montré que le pycnogenol possède des propriétés hautement protectrices contre plusieurs maladies telles que les dysfonctionnements cardiovasculaires (Watson *et al.*, 2004), les maladies rénales, les dysfonctionnements hépatiques (Wang *et al.*, 2018), les troubles neuro-cognitifs (Simpson *et al.*, 2019), le diabète (Gulati *et al.*, 2005), les problèmes de la reproduction et la stérilité, les maladies de la peau, le cancer, la digestion, les maladies rétinienne et autres dysfonctionnements (Chowdhury *et al.*, 2017). Des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoire et analgésique ont été également montrées avec les extraits et les huiles essentielles de plantes du genre *Pinus* (Demirci *et al.*, 2015; Kaushik *et al.*, 2012)

## IV.2. *Quercus ilex*

### IV.2.1. Description et classification botanique

Le genre *Quercus* (Fagaceae) est l'un des groupes d'arbres tempérés les plus diversifiés avec plus de 500 espèces réparties dans le monde entier (Mehrnia *et al.*, 2013). Le genre *Quercus* est l'un des clades les plus importants d'angiospermes ligneux de la moitié nord du globe en termes de diversité des espèces, de dominance écologique et de valeur économique. (Wani et Hussain, 2017)

Le chêne vert (*Quercus ilex* L.), est un élément typique des forêts algériennes semi-aride (Araba *et al.*, 2014). Il se présente sous forme d'un arbre ou arbrisseau de 2-15 mètres. Caractérisé par un tronc court et un huppier dense arrondi. L'écorce est noirâtre à écailles petites et plus ou moins carrées, finement fissuré. Les jeunes rameaux sont d'abord pubescents et blanchâtres, puis gris verdâtre et glabrescents. Ses feuilles sont alternes, coriaces, petites, de forme variable (entières, lâchement dentées ou épineuse), à court pétiole, vert foncé et luisant dessus, pubescentes et blanchâtres au dessous, a plus de 5 paires de nervures. Ses glands sont bruns, de 1 à 3 cm de long (figure 9) (Rameau *et al.*, 1989). La taxonomie de *Quercus ilex* selon est la suivante:

Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Fagales
Famille :	Fagaceae
Genre :	<i>Quercus</i>
Especie :	<i>Quercus ilex</i> L.

### IV.2.2. Usage traditionnel

Le chêne vert est largement utilisé dans les pays méditerranéens en médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée, l'ulcère gastrique et les infections cutanées (Kenouf *et al.*, 2003 ; Berahou *et al.*, 2007). L'écorce des racines est particulièrement utilisée dans l'Est de l'Algérie pour soulager des troubles gastro-intestinaux. Dans certains cas, les glands sont inclus dans le régime alimentaire humain, notamment sous forme de farine, utilisée dans la fabrication de pain ou comme boisson de substitution au café après un processus de torréfaction (Vinha *et al.*, 2016). D'autres espèces du genre *Quercus* sont utilisées à travers le monde pour le traitement de maladies diverses. La poudre des fruits de *Quercus leucotrichophora* est utilisée pour traiter les infections urinaires et les bourgeons pour le



**Figure 9.** Photographie de *Quercus ilex* dans la région de Medjana (BBA).

traiter les hémorroïdes, alors que les feuilles sont utilisées comme astringent et pour le traitement de la diarrhée (Joshi et Juyal, 2017).

#### **IV.2.3. Phytochimie et propriétés biologiques**

Les plantes du genre *Quercus* sont dotées de propriétés thérapeutiques intéressantes liées à la présence de métabolites secondaires reconnus pour leurs effets biologiques. Les polyphénols, sont parmi les métabolites secondaires connus pour leurs vertus préventifs et curatifs à la fois. Vinha et ses collaborateurs (2016) ont montré que la teneur totale en composés phénoliques dans les glands de différentes espèces de *Quercus*, dont *Q. ilex*, va de 18 à 32  $\mu\text{g}$  d'EAG/mg d'extrait. Cependant, Ratibi et ses collaborateurs (2017) ont rapporté une teneur en composés phénoliques de 52,5  $\mu\text{g}$  d'EAG/mg d'extrait sec des glandes, avec un contenu important en flavonoïdes et en tanins. Ferreira et ses collaborateurs (2019) ont rapporté des teneurs beaucoup plus élevées en tanins dans l'écorce de *Quercus faginea*.

Bien que les effets bénéfiques des tannins restent controversés et dépendent directement du dosage et du type de tanin (Chung *et al.*, 1998 ; Mena *et al.*, 2015), les effets bénéfiques des flavonoïdes sont largement documentés dans la bibliographie (Kumar et Pandey, 2013). Vinha et ses collaborateurs (2016) ont rapporté la présence, dans les glandes de quercus, d'acides phénoliques (acide gallique et acide ellagique) et des flavonoïdes

(epigallocatechine, quercétine pentoside, catéchine gallate, epicatechine gallate, kaempferol hexoside, epicatechine hexoside, epigallocatechine gallate, quercetine-3-o-glucoside, myricetin hexoside).

D'autre part, Charef et ses collaborateurs (2008) ont signalé que la composition en acides gras de l'huile de glands de *Q. ilex* est similaire à celle de l'huile de *Pistacia lentiscus* et d'autres huiles végétales comestibles telles que celles de tournesol, cacahuète, olive et avocat.

## **I. Matériel**

### **I.1. Matériel végétal**

Les racines de *Quercus ilex* et les jeunes cônes femelles de *Pinus halepensis* ont été collectés au mois de mai 2012 dans la région de Medjana (Bordj Bou Arreridj), à l'Est de l'Algérie. Les plantes ont été identifiées par Pr. Houssine Laouar, de l'université de Sétif. Le matériel végétal est nettoyé et séché à l'air libre à température ambiante, puis réduit en poudre et stockée à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

### **I.2. Animaux**

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris albinos BALB/c d'un poids allant de 25 à 30 g. Ces souris ont été procurées aux prés de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux ont été répartis groupes comportant 7 à 9 chacun et hébergés dans des cages de polypropylène à température ambiante, avec accès libre à l'eau et à l'alimentation. L'aliment est fourni par l'office national des aliments de bétails (ONAB) de Bejaia. Après une période d'adaptation de 7 jours, les souris sont pesées, marquées puis soumises à un jeun d'une nuit avant leur utilisation.

### **I.1. Sang humain**

Le sang humain utilisé pour l'isolement des neutrophiles est obtenu fraîchement par prélèvement veineux au pli du coude de volontaires sains, non fumeurs n'ayant pas pris de médicaments de toutes sorte, au moins durant les quinze derniers jours qui ont précédé le prélèvement. Le sérum, utilisé comme source d'opsonine dans le test de la phagocytose, est obtenu à partir du sang veineux pris du volontaire de chaque expérience.

### **I.4. Microorganismes**

La culture de *Candida albicans* (*C. albicans*) est obtenue après ensemencement d'une souche isolée cliniquement (laboratoire d'analyses médicales El-bibane, Bordj Bou Arreridj) sur un milieu sabouraud dextrose agar (SDA) contenant de la gentamicine et du chloramphénicol en plus d'une substance chromogène. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

## II. Méthodes

### II.1. Préparation des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex*

Les extraits méthanoliques de *P. halepensis* et *Q. ilex* ont été préparés selon la méthode de Motamed et Naghibi (2010). Brièvement, 100 g de poudre de l'écorce de racines de *Q. ilex* ou de jeunes cônes femelles de *P. halepensis* sont mis à macération dans un mélange méthanol/eau (8:2 V/V), sous agitation douce pendant 24 heures à l'ombre et à température ambiante. Après filtration, le méthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite à 40°C dans un rotavapor (BÜCHI). Les solutions obtenues sont lyophilisées pour obtenir des poudres brunes qui seront conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

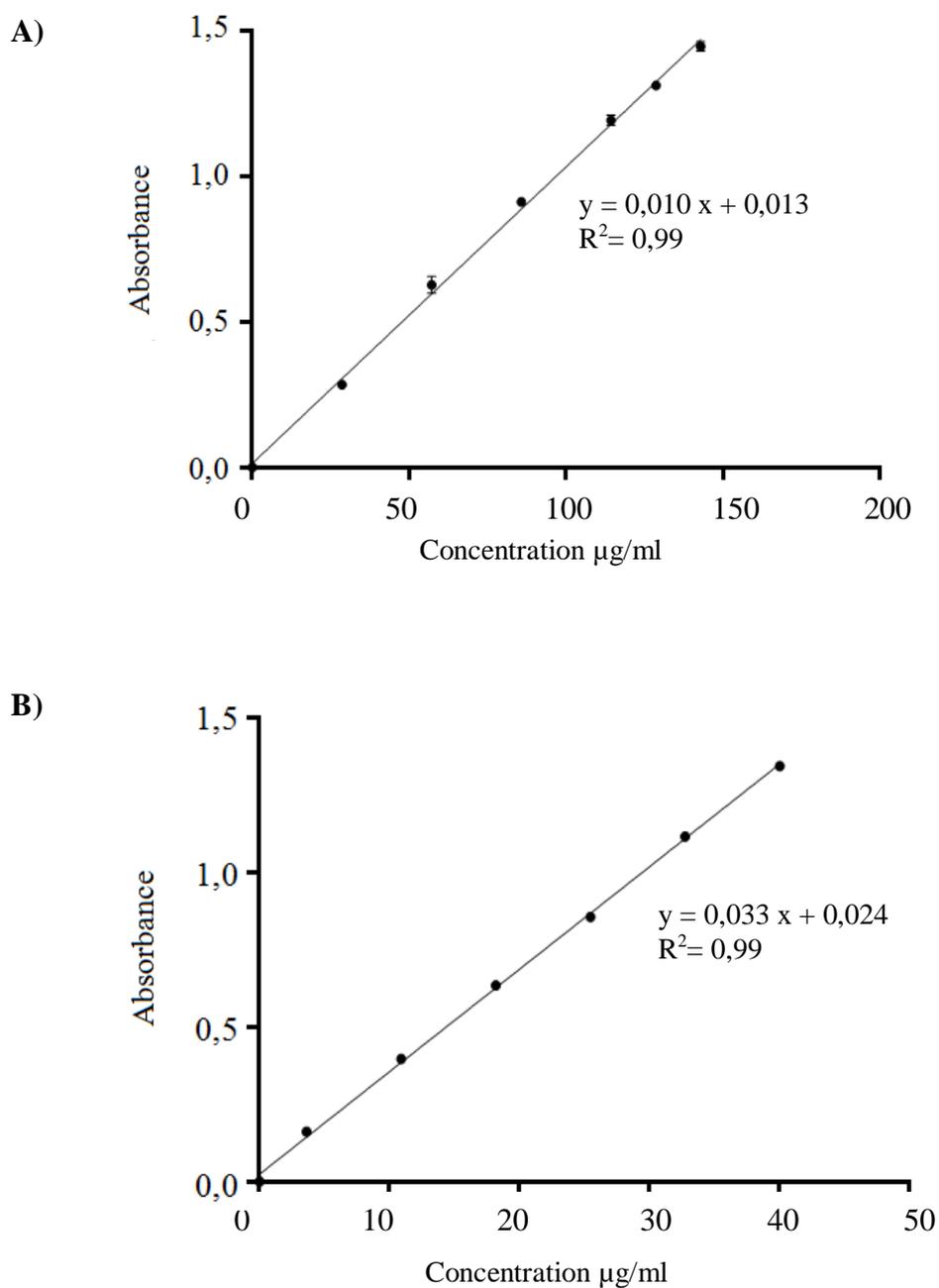
### II.2. Analyses phytochimiques

#### II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en composés phénoliques totaux des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* ont été mesurées par la méthode décrite par Li et ses collaborateurs (2007). Pratiquement, un volume de 200 µl de solution d'extraits à différentes concentrations (125, 250 et 500 µg/ml) est ajouté à 1 ml de réactif de Folin–Ciocalteu (dilué à 1:10 dans de l'eau distillée). Quatre minutes après, 800 µl de solution saturée de carbonate de sodium sont ajoutés au mélange réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux de l'extrait est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique comme standard (figure 10). Le résultat est exprimé en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg EAG/mg extrait).

#### II.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Pour déterminer la teneur totale en flavonoïdes dans les extraits étudiés, la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par Bahorun et ses collaborateurs (1996) a été utilisée. En bref, 1 ml d'extraits (0,25 à 0,5 mg/ml) est mélangé avec le même volume d'une solution de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 2% préparée dans du méthanol. Après 15 min, l'absorbance du mélange est déterminée à 430 nm avec un spectromètre UV-Visible (Specord 200 Plus, Analytik Jena, Allemagne) (marque et type). La quantité de flavonoïdes contenue dans les extraits est calculée à partir d'une droite d'étalonnage établie avec la quercétine (figure 10) et est exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait. (mg EQ/g extrait).



**Figure 10.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique (A), et de la quercétine (B). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions  $\pm$  SD.

### II.2.3. Dosage des tanins

La détermination de la teneur en tanins totaux dans les extraits étudiés a été réalisée selon le protocole décrit Gharzouli et ses collaborateurs (1999). Cette méthode est basée sur la capacité des tanins à former un complexe insoluble avec l'hémoglobine issue de l'hémolyse du sang bovin. Un millilitre de la solution d'hémoglobine ajusté à une densité optique égale à 1,6 est mélangé avec un 1 ml de solutions des deux extraits à différentes concentrations. Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé à 4000 rpm à 4°C pendant 10 min et les absorbances des surnageants sont mesurées à 576 nm. La concentration des tanins totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (figure 11) établie avec l'acide tannique (0-1000 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalent d'acide tannique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg extrait).

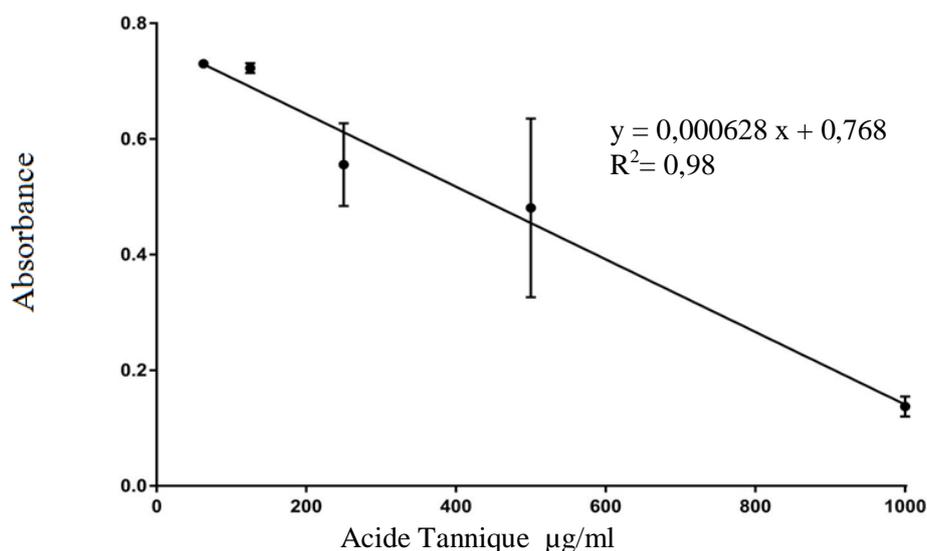


Figure 11. Droite d'étalonnage de l'acide tannique.

### II.2.4. Analyse HPLC

L'analyse chromatographique des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* a été réalisée par HPLC-TOF-MS selon le protocole décrit par Demirtaş et ses collaborateurs (2013). Un chromatographe Agilent série 1260 infinity (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA), couplé à un spectromètre de masse 6210 à temps de vol (TOF/MS), avec une colonne de type ZORBAX SB-C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 µm) est utilisé.

La phase mobile consiste en un mélange de deux solvants A (acétonitrile) et B (acide formique) à 0,1% selon le gradient suivant: 0-1 min 10% B, 1-20 min 50% B, 20-23 min

80% B, 23-25 min 0% B, 25-30 min 10% B. les extraits (200 µg) sont solubilisés dans le méthanol puis filtrés à travers un filtre PTFE (0,45µm). Le volume injecté est de 10 µl. Le débit du solvant est de 0,6 ml/min et la température de la colonne est de 35°C.

Le mode d'ionisation de l'instrument HPLC-TOF/MS est négatif et fonctionne avec une température du gaz d'azote de 325°C, un débit d'azote gazeux est de 0,7 ml/min, un nébuliseur de 40 psi, un voltage capillaire de 4000 volts et un voltage du fragmenteur de 175 volts.

### **II.3. Toxicité aiguë des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex***

La toxicité aiguë des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* a été évaluée selon la méthode décrite dans la ligne directrice de L'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) code 423 (OCDE, 2002). En bref, deux doses de 300 et 2000 mg/kg de chaque extrait sont administrées par voie orale à deux groupes comportant six souris femelles chacun avec un poids de 20 à 25 g. Les animaux sont observés attentivement pendant les 4 premières heures et quotidiennement par la suite, pour un total de 14 jours, afin d'apprécier les changements de comportements, les symptômes de toxicité et la mort des animaux.

### **II.4. Activité antioxydante des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex***

#### **II.4.1. Test de DPPH**

L'évaluation de l'effet scavenger des extraits étudiés envers un radical libre relativement stable (DPPH), a été réalisée selon le protocole décrit par Saija et ses collaborateurs (1989). Des aliquotes de 37,5 µl d'extraits à différentes concentrations (01 - 70 µg/ml) sont ajoutées à 1,5 ml d'une solution de DPPH (100 mM) préparée dans du méthanol. Le mélange est fortement agité puis laissé au repos à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est ensuite mesurée à 517 nm. Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon la formule suivante:

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

#### **II.4.2 Réduction du radical cation ABTS<sup>•+</sup>**

La capacité des extraits étudiés à piéger le radical ABTS<sup>•+</sup> (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) a été évaluée selon la méthode décrite par Kutlu et ses collaborateurs (2014). Le radical ABTS<sup>•+</sup> est généré par une réaction entre ABTS (1,7 mM) et

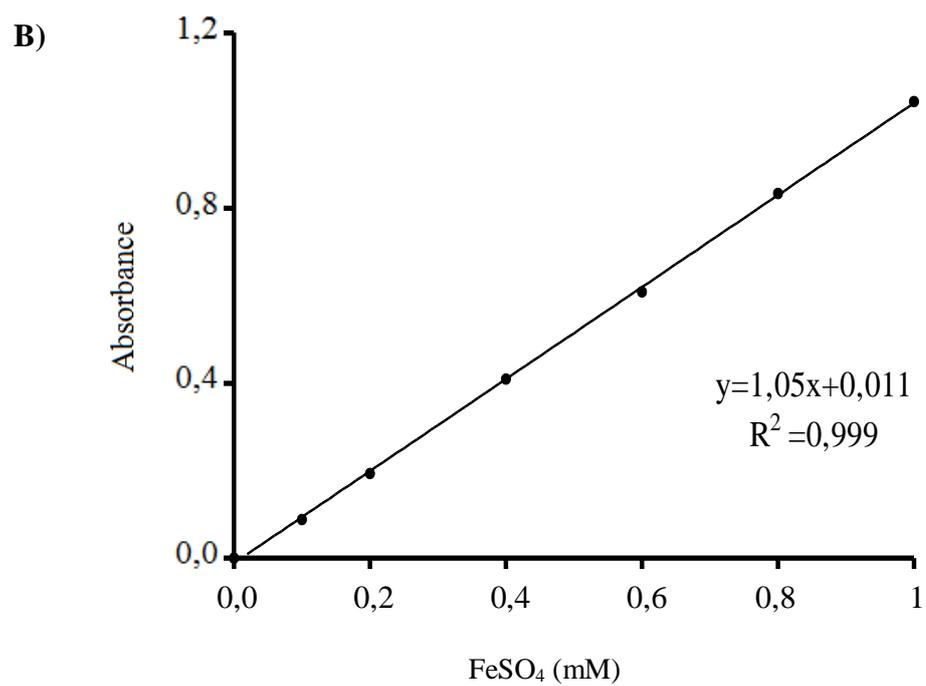
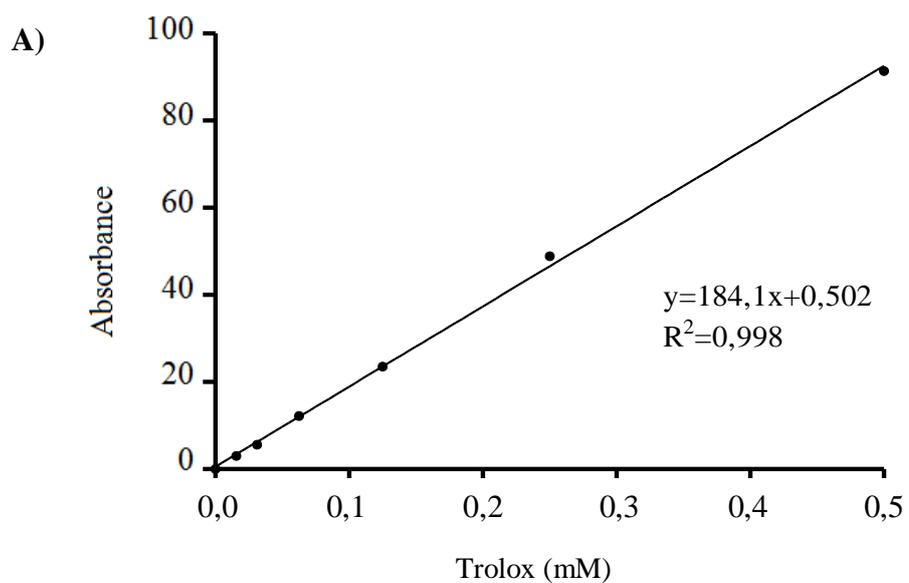
le persulfate de potassium (4,8 mM). Le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 à 16 h avant l'utilisation. La solution de ABTS est ensuite diluée avec du sérum physiologique tamponné à pH 7,4 jusqu'à l'obtention d'une absorbance de  $0,7 \pm 0,02$  à 734 nm. Un volume de 2 ml de la solution ABTS<sup>•+</sup> est ajouté à 50 µl d'extraits à différentes concentrations (0,02 à 01 mg/ml). La décroissance de l'absorbance est suivie à 734 nm pendant 6 min. La diminution de l'absorbance des échantillons indique une activité scavenger vis-à-vis du radical cation ABTS<sup>•+</sup>. La capacité antioxydante est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage (figure 12) établie avec le Trolox (0,015-0,5mM) et exprimée en millimole d'équivalent trolox par milligramme d'extrait.

#### **II.4.3. Pouvoir anti-oxydant par réduction du fer (FRAP)**

Le pouvoir antioxydant par réduction du fer connu par FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) a été évalué selon la méthode décrite par Benzie et Strain (1996). Le réactif FRAP est préparé en mélangeant une solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) avec du FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (20mM) et un tampon acétate (300 mM acétate de sodium, pH conduit à 3,6 par l'acide acétique) avec des proportions de 10:1:1 (v/v), respectivement. Cinquante microlitres de solution méthanolique à différentes concentrations (0,02 à 0,5 mg/ml) des extraits sont ajoutés à 1 ml de réactif FRAP. L'absorbance des mélanges réactionnels est ensuite mesurée à 593 nm après 4 min d'incubation à température ambiante. Une solution de sulfate de fer (100-1000 µM) est utilisée pour la préparation de la courbe d'étalonnage à partir de la quelle les valeurs FRAP des extraits sont déterminées et sont exprimées en mM du FeSO<sub>4</sub>/mg d'extrait.

#### **II.4.4. Test d'hémolyse**

L'effet protecteur des extraits de *Q. ilex* et *P. halepensis* vis-à-vis de l'hémolyse induite par l'exposition aux radicaux produits par la décomposition thermique de l'AAPH, a été évalué selon la procédure décrite par Girard et ses collaborateurs (2006). Le sang est prélevé par ponction cardiaque directe chez des souris anesthésiées, puis dilué à 2% dans un tampon physiologique (NaCl 125 mM, phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4). Dans les puits d'une plaque à 96 puits, 120 µl de suspension d'érythrocytes à 2% sont préincubés pendant 30 min avec 60 µl de différentes concentrations d'extraits (12,5 ; 25 ; 50 et 75 µg/ml) ou de trolox (50 et 75 µg/ml) à 37°C. Un volume de 120 µl d'une solution d'AAPH (100 mM) est ensuite ajouté à chaque puits et le mélange est incubé à 37°C. La cinétique de l'hémolyse



**Figure 12.** Droite d'étalonnage du trolox (A) et de FeSO<sub>4</sub>(B).

est suivie en mesurant la diminution de l'absorbance à 630 nm, en utilisant un lecteur de microplaques (ELX 800, Bio-TEK, USA). Le Trolox est utilisé comme antioxydant de référence, alors qu'une solution physiologique tamponnée a sert de témoin.

#### II.4.5. Test de l'oxydation de l'ADN induite par la photolyse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L'effet protecteur des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* contre les dommages oxydatifs de l'ADN a été étudié sur l'ADN plasmidique pBluescript M13 (+) selon le protocole décrit par Kizil *et al* (2011). L'endommagement de l'ADN est induit par photolyse de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sous l'effet de radiations UV. L'ADN plasmidique pBluescript M13+, isolé à partir de *E. coli* XL-1 Bleue, est oxydé par un traitement avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV. En bref, 200 ng d'ADN plasmidique sont mis en suspension dans un tampon phosphate 7,14 mM à pH 7,4 contenant du NaCl 15 mM. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ajouté à une concentration finale de 2,5 mmol/L, en présence ou en absence de 1 µl de différentes concentrations (100, 250, 350 et 500 µg/ml) d'extraits étudiés. Les réactions sont initiées par irradiation UV (300 nm) et se poursuivent pendant 5 min sur la surface d'un transilluminateur UV à température ambiante avec une intensité de 8000 mW/cm<sup>2</sup>. Après irradiation, l'endommagement de l'ADN est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1% . Le mélange réactionnel (10 µl) est déposé dans les puits du gel. L'électrophorèse est réalisée à 40 V pendant 3 h en présence de bromure d'éthidium (10 mg/ml). L'ADN plasmidique pBluescript M13+ non traité est utilisé comme témoin dans chaque essai d'électrophorèse sur gel ou avec un traitement partiel (traitement UV ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seulement). Le gel obtenu est soumis à une analyse densitométrique pour quantifier chaque bande en utilisant le logiciel gel documentation system (Gel- Doc - XR, BioRad, Hercules, CA, USA).

Le pourcentage d'inhibition de la scission des brins d'ADN est calculé selon la formule

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - (\text{Sm+a} - \text{Sc}) / (\text{Sm} - \text{Sc}).$$

**Sm+a** = % restant d'ADN superenroulé après traitement par UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des extraits.

**Sc** = % restant d'ADN superenroulé dans le plasmide témoin non traité.

**Sm** = % restant d'ADN superenroulé traité avec l'UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en absence d'extraits.

## II.5. Activité anti-inflammatoire

### II.5.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris

La méthode de Rotelli et ses collaborateurs (2003), a été utilisée pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène. Quatre groupes de souris sont utilisés dans ce test.

Les souris des groupes traités reçoivent par voie orale une heure avant l'induction de l'œdème, 200 mg/kg d'extraits ou 50 mg/kg d'indométacine (anti-inflammatoire standard). Les souris du groupe témoin reçoivent 0,2 ml d'une solution de NaCl 0,9 %.

L'œdème de l'oreille est induit par l'application locale de 30 µl de xylène sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris des quatre groupes, à l'aide d'une micropipette. L'épaisseur de l'oreille est mesurée avant et une demi-heure après l'induction de l'inflammation par un pied à coulisse digital (Delaporte *et al.*, 2004). La différence de l'épaisseur avant et après l'application du xylène est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$$

### II.5.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

L'évaluation de l'effet anti-œdémateux du traitement local par les extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* a été réalisé selon la méthode décrite par Manga et ses collaborateurs (2004). Un volume de 15µl d'une solution acétone/eau (1:1) contenant 80 µg d'huile de Croton est appliqué localement sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris des quatre groupes utilisés dans ce test. Les souris des groupes traités reçoivent localement sur la face interne de l'oreille 2mg/oreille d'extraits ou bien 0,5 mg/oreille d'indométacine avec le mélange acétone/eau contenant l'huile de croton. Les souris du groupe témoin reçoivent uniquement la solution d'huile de croton.

L'épaisseur de l'oreille est mesurée avant le traitement et six heures après l'induction de l'inflammation. L'activité anti-inflammatoire exprimée en pourcentage d'inhibition de l'œdème est calculé selon la formule précédente.

## **II.6. Effet des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* sur les fonctions du neutrophile**

### **II.6.1. Isolement des neutrophiles humains**

Les neutrophiles humains sont fraîchement isolés juste avant chaque expérience selon la méthode adaptée par Bouriche et ses collaborateurs (2003). Dix millilitres de sang sont prélevés dans des tubes de centrifugation de 15 ml contenant de l'héparinate de lithium (5 U/ml) comme anticoagulant. Dans un premier temps, les érythrocytes sont séparés des autres cellules sanguines par sédimentation en présence de 2 ml de dextran 10 %. Après une heure de sédimentation à température ambiante, le plasma enrichi en leucocytes est récupéré puis déposé délicatement sur une couche de 2 ml de ficoll dans un tube de centrifugation en polypropylène. Le tube est ensuite soumis à une centrifugation à 1000 rpm pendant 25 min à 4°C (Rotina R 35 Germany) et le culot contenant les polynucléaires neutrophiles est récupéré. Les hématies résiduelles sont soumises à une série de lyses hypotoniques par l'addition de 1 ml de l'eau distillée fraîche et froide pendant 30 secondes, suivies par l'addition de 5 ml de HBSS1 fraîches. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 1000 rpm pendant 10 min à 4°C. La lyse hypotonique est répétée jusqu'à l'élimination totale des hématies contaminantes. A la fin de la dernière centrifugation, les neutrophiles sont suspendus dans l'HBSS1 et conservés dans un bain de glace (figure 13).

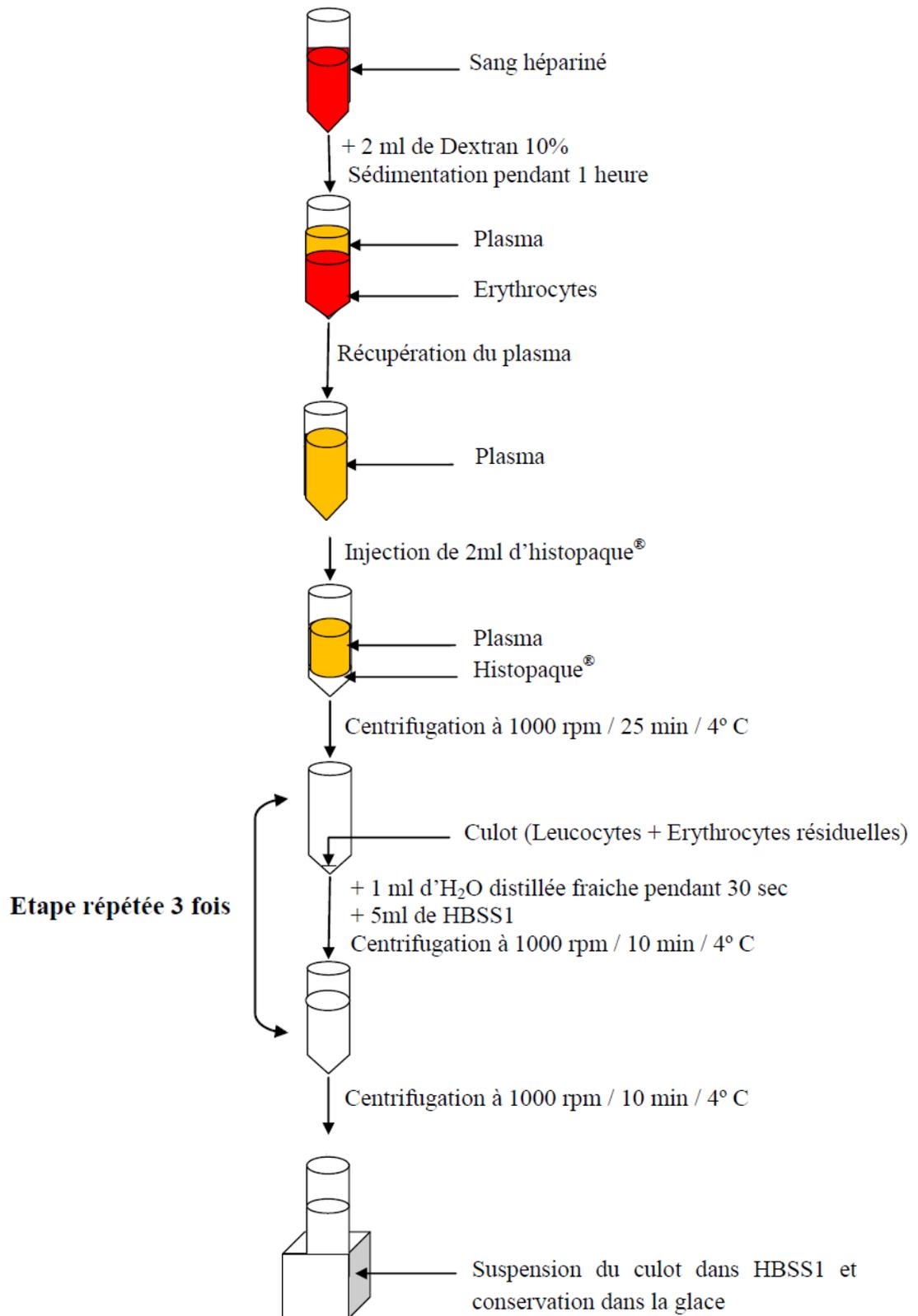
### **II.6.2. Viabilité des neutrophiles isolés**

La viabilité des neutrophiles est évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Pour cela, 250 µl de la suspension cellulaire ( $3 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés en présence de 250 µl de la solution de bleu de Trypan (0,4%) pendant 10 min à 37°C. Les cellules viables ont la propriété de ne pas internaliser le bleu de trypan par l'action de leur barrière cytoplasmique active, contrairement aux cellules non viables. C'est ainsi qu'après cette coloration les cellules non viables se colorent en bleu, alors que les cellules viables restent incolores. Après comptage sous microscope sur une cellule de Thoma, le pourcentage de la viabilité cellulaire est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = [(NT - NNV) / NT] \times 100$$

\* **NT** : Nombre total de cellules comptées (viable et non viable).

\* **NNV** : Nombre de cellules non viables.



**Figure 13:** Etapes d'isolement des neutrophiles à partir du sang humain.

### II.6.3. Pureté des neutrophiles isolés

La pureté des neutrophiles isolés est contrôlée par la méthode du frottis. Une goutte de la suspension cellulaire est étalée sur une lame en verre, puis fixée par le méthanol pendant 5 min, suivie d'une coloration par le Wright Stain pendant 2 min. le frottis est ensuite observé sous microscope à l'aide d'un objectif X40. Le pourcentage de neutrophiles dans la suspension cellulaire est déterminé en comptant le nombre de neutrophiles parmi 100 cellules comptées aléatoirement dans le frottis.

### II.6.4. Cytotoxicité des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex*

La cytotoxicité des extraits testés dans la présente étude a été évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Pour cela, 250 µl de la suspension des neutrophiles ( $3 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés en présence de différentes concentrations d'extraits à 37°C pendant 30 min. Puis un volume équivalent de la solution de bleu de Trypan (0,4%) est ajouté. Après 10 min d'incubation à 37°C le pourcentage de viabilité cellulaire est estimé comme précédemment décrit.

### II.6.5. Effet sur l'activité de l'élastase

L'activité de l'élastase libérée par les neutrophiles est évaluée selon la méthode décrite par Bieth et ses collaborateurs (1974). La suspension des neutrophiles, ajustée à une concentration cellulaire de 5,5 millions de cellules/ml, est incubée pendant 15 min à 37°C dans HBSS2 en présence de la cytochalasine B ( $10^{-5}$  M) et de l'fMLP ( $10^{-6}$ M) comme agent stimulants. Le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min. Ensuite, 75 µl de surnageant sont incubés pendant 10 min à 37°C dans les puits d'une plaque d'ELISA en présence de différentes concentrations de *P. halepensis* et *Q. ilex*. Un volume de 75 µl de substrat spécifique de l'élastase (N-Méthoxy-Suc-(Ala)<sup>2</sup>-Pro-Val-p-Nitroanilide,  $10^{-4}$  M) préparé dans le méthyle 2-pyrulidone et dilué dans le tampon HEPS 0,1M sont ajoutés. La plaque est réincubée à 37°C pendant 25 min. L'activité de l'élastase est déterminée par mesure de l'absorbance de p-nitroanilide libéré dans le milieu à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Elx 800, Biotek, USA). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité de l'élastase par rapport au contrôle sans extraits considéré comme le 100 % d'activité.

### II.6.6. Effet sur l'activité de la myéloperoxydase

L'effet des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* sur l'activité de la myéloperoxydase a été évalué par la méthode décrite par Maruyama et ses collaborateurs (2005). La suspension

des neutrophiles, ajustée à une concentration cellulaire de 5,5 millions de cellules/ml, est incubée pendant 15 min à 37°C dans HBSS2, en présence de 25 µL de fMLP/Cytochalasine B ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M). Après centrifugation pendant 10 min à 400 g, 25 µl du surnageant enzymatique sont déposés dans les puits d'une plaque d'ELISA avec 25 µl de d'une solution de tetraméthyle benzidine 1,6 mM préparée dans le diméthyle sulfoxyde, en présence ou en absence de 30 µl de différentes concentrations des deux extraits étudiés. La réaction est initiée par l'addition de 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,003% préparé dans le tampon phosphate pH 5,4 contenant 0,05 % de HTAB). La réaction est arrêtée après 5 min d'incubation à 37°C par l'ajout de 50 µl d'acide sulfurique à 2 mol/L. L'absorbance est ensuite mesurée à 450 nm. L'activité enzymatique est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle où l'extrait est remplacé par le PBS et qui représente 100% d'activité.

#### **II.6.7. Effet sur la flambée respiratoire**

L'effet des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* sur la flambée respiratoire à été évalué selon la méthode de Cohen et Chovaniac (1978). La quantité d'anions superoxydes générés par les neutrophiles est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire du ferricytochrome c (FC) réduit :  $\epsilon_{550\text{ nm}} = 21,1\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . La suspension cellulaire des neutrophiles est ajustée à une concentration de 2,5 millions de cellules/ml. Dans des tubes eppendorf de 1 ml, 400 µl de suspension de neutrophiles sont incubés pendant 10 min à 37°C avec 100 µl de différentes concentrations des deux extraits étudiés. Un volume de 100 µl de fMLP/Cytochalasine B ( $10^{-6}$  M/ $10^{-5}$  M) et 100 µl de cytochrome c (0,2 mg/ml) sont par la suite additionnés et le tout est incubés pendant 15 min à 37 °C. La spécificité de la réaction est vérifiée en utilisant la superoxyde dismutase (330 UI/ml). Enfin, les tubes eppendorf sont centrifugés pendant 5 min à 400 g et à 4 °C et l'absorbance des surnageant est mesurée à 550 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la génération d'anions superoxydes exercée par les extraits en fonction de leur concentration par rapport au contrôle considéré comme le 100% d'activité.

#### **II.6.8. Test de phagocytose**

L'effet des extraits étudiés sur la phagocytose de *C. albicans* par les neutrophiles a été évaluée *ex vivo* selon la méthode décrite par Ortega et ses collaborateurs (1993). Les cellules fraîches de *C. albicans* sont obtenues 24 à 48 h après réensemencement sur milieu sélectif chromogène.

La concentration de la suspension cellulaire des neutrophiles est ajustée à un million de cellules par ml. Dans des tubes en verre (5 ml), 500 µl de suspension de neutrophiles sont incubés pendant 10 min à 37°C avec différentes concentrations de *P. halepensis* et *Q. ilex* (25, 50 et 100 µg/ml). Ensuite, 500 µl de la suspension de *C. albicans* ajustée à 1 million de cellules par ml sont ajoutés pour obtenir un rapport de 1:1 (levure/neutrophile). Un volume de 50 µl de sérum est ajouté au mélange pour servir de source d'opsonine. Le tout est incubé dans un bain marie à 37 °C sous agitation douce pendant 50 min. Ensuite, 2 ml de bleu de méthylène (0,01%) sont ajoutés et les tubes sont remis de nouveau au bain marie. Après 10 min supplémentaire d'incubation, les tubes sont centrifugés à 300 g pendant 10 min et les deux tiers du surnageant sont éliminés. Le reste du surnageant est homogénéisé et des aliquotes de 20 µl sont déposés sur une cellule de Thoma pour compter le nombre de *C. albicans* ingérés par les neutrophiles à l'aide d'un microscope optique (Zeiss, Germany). Les résultats sont exprimés en indice de phagocytose (nombre de *Candida* phagocytées par 100 neutrophiles) et en pourcentage de phagocytose (nombre de neutrophile ayant phagocyté au moins une levure). Les pourcentages d'inhibition résultants de chaque traitement sont calculés pour ces deux paramètres par rapport au contrôle non traité qui représente le 100%.

## II.7. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD ou SEM. Les valeurs IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse ainsi que la détermination des HT50 sont effectués par un logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test ANOVA univariée suivi du test de Dunnett pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## I. Analyse phytochimique

### I.1. Dosage des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes et des tanins

Les polyphénols constituent l'un des groupes les plus importants des métabolites secondaires des plantes. Les diverses activités biologiques des plantes sont souvent attribuées aux polyphénols. (Watson *et al.*, 2013; Zhang et Tsao, 2016). L'extrait de *Q. ilex* montre une teneur élevée en ces composés, qui est deux fois plus élevée que celle trouvée dans l'extrait de *P. halepensis* (tableau 1).

Très peu d'études antérieures ont porté sur le contenu phénolique de l'écorce de la racine de *Q. ilex* et aucune étude n'a été menée sur le contenu phénolique de jeunes cônes femelles de *P. halepensis*. Kouachi et Derouiche (2018) ont montré que la teneur de l'extrait aqueux de l'écorce de *P. halepensis* en composés phénolique est de  $34,10 \pm 1,77$   $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait. D'autre part, dans leur étude phytochimique des différentes parties du pin d'Alep (*P. halepensis*) de la Palestine, Salim et ses collaborateurs (2019) ont rapporté des teneurs élevées en composés phénoliques de l'ordre de 369 et 431,18  $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait sec dans l'extrait méthanolique de l'écorce et des connes respectivement. Ferreira et ses collaborateurs (2019) ont trouvé que la teneur des composés phénoliques dans l'extrait hydro-alcoolique de l'écorce d'une espèce du même genre : *Quercus faginea* est de  $630,3 \pm 127,78$   $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait sec. Vinha et ses collaborateurs (2016) ont montré que la teneur totale en composés phénoliques dans les tissus des glands de différentes espèces de *Quercus*, dont *Q. ilex*, varie de 18 à 32  $\mu\text{g}$  d'EAG/mg d'extrait. Ratibi et ses collaborateurs (2017) ont rapporté une teneur en composés phénoliques de 52,5  $\mu\text{g}$  d'EAG/mg d'extrait sec des glandes de la même plante.

Les flavonoïdes représentent le groupe de composés naturels le plus diversifié et le plus répandus. Ils sont probablement les composés phénoliques naturels les plus importants. Ces composés possèdent un large spectre d'activités chimiques et biologiques, y compris des propriétés d'élimination des radicaux libres. Les résultats de la présente étude ont montré que, contrairement au contenu phénolique, le contenu en flavonoïdes de l'extrait de *P. halepensis* ( $3,69 \pm 0,19$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait sec) est proche de celui de l'extrait de *Q. ilex* ( $3,11 \pm 0,04$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait sec) (tableau 1).

Kouachi et Derouiche (2018) ont rapporté une teneur similaire de flavonoïdes dans l'extrait aqueux de l'écorce du pin d'Alep d'Algérie ( $3,27 \pm 0,49$   $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait sec). La teneur en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique des connes du pin d'Alep palestinien rapportées par Salim et ses collaborateurs (2019) sont nettement plus élevées (193,25 mg équivalent catéchine/g extrait sec). Dans leur étude phytochimique sur les glands du chêne

vert (*Q. ilex*), Ratibi et ses collaborateurs (2017), ont trouvé une teneur en flavonoïdes de  $18,54 \pm 2,22$  µg EQ/mg de l'extrait méthanolique sec.

De la même manière que pour les flavonoïdes, les teneurs des deux extraits étudiés en tanins totaux sont très rapprochées dans les deux extraits étudiés avec une valeur moyenne de  $44,75$  µg EAT/mg (tableau 1). L'étude réalisée par Ratibi et ses collaborateurs (2017) a montré une teneur en tanins de  $30,50 \pm 4,33$  µg d'EAT/mg d'extrait sec des glands du chêne vert. Ferreira et ses collaborateurs (2019) ont trouvé que l'extrait hydro-alcoolique de l'écorce de *Quercus faginea* contient une quantité de tanins condensés de  $220,74 \pm 54,15$  µg EAG/mg d'extrait sec.

Abdalla et ses collaborateurs (2014) ont fait une caractérisation des tanins de l'écorce de *Pinus halepensis* et ont trouvé que l'extrait aqueux contient des proanthocyanidines avec un taux de  $13,53 \pm 0,016$  µg d'équivalent catéchine/mg d'extrait sec et des gallotanins avec un taux de  $1,95 \pm 0,802$  µg EAG/mg d'extrait sec.

**Tableau 1.** Teneur des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins.

Extrait	Polypénols totaux (µg EAG/mg extrait)	Flavonoïdes totaux (µgEQ/mg extrait)	Tanins totaux (µg EAT/mg extrait)
<i>Quercus ilex</i>	$490,81 \pm 29,62$	$3,11 \pm 0,04$	$44,66 \pm 7,22$
<i>Pinus halepensis</i>	$251,40 \pm 7,07$	$3,69 \pm 0,19$	$44,85 \pm 5,31$

EAG = équivalent d'acide gallique, EQ = équivalent quercétine, EAT = équivalent d'acide tannique. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

La répartition des composés phénoliques entre les différentes parties de la plante, le stade de développement de la plante, la localisation géographique (conditions climatiques, et nature du sol) ainsi que la différence dans les méthodes de dosage pourraient être à l'origine des différences observées dans les résultats de différents travaux (Males *et al.*, 2010; Tolić *et al.*, 2017).

## I.2. Analyse HPLC

Les résultats de la composition en polyphénols des extraits sont présentés dans le tableau 2. D'après le temps de rétention des composés standards, l'extrait de *Q. ilex* présente un profil chimique comportant six composés phénoliques identifiés (figure 14). Le composé phénolique dominant est la catéchine, suivi de l'acide caféique. Les acides gentisique et hydroxybenzoïque sont les composés mineurs dans l'extrait de *Q. ilex*.

Ces résultats se concordent partiellement avec la recherche phytochimique de García-Villalba et ses collaborateurs (2017), qui ont étudié la composition des feuilles de différentes espèces de *Quercus* et qui ont identifié neuf acides phénoliques (acide gallique, acide 3,4-dihydroxybenzoïque, acide chlorogénique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide 4-C-caféoylquinique, acide caféique, acide coumarique, acide férulique et acide salicylique). Ils ont également signalé que les flavonoïdes prédominants chez toutes les espèces de *Quercus* sont la catéchine et la gallocatéchine.

D'une autre part, deux composés phénoliques seulement sont identifiés dans l'extrait de *Pinus halepensis*, la catéchine qui représente le principal composé phénolique de l'extrait et l'acide cinnamique. En comparaison avec l'extrait de *Q. ilex*, la concentration de la catéchine dans l'extrait de *P. halepensis* est deux fois plus élevée que celle de l'extrait de *Q. ilex*. Ce résultat pourrait expliquer la haute teneur en flavonoïdes obtenue par la méthode à l' $\text{AlCl}_3$ .

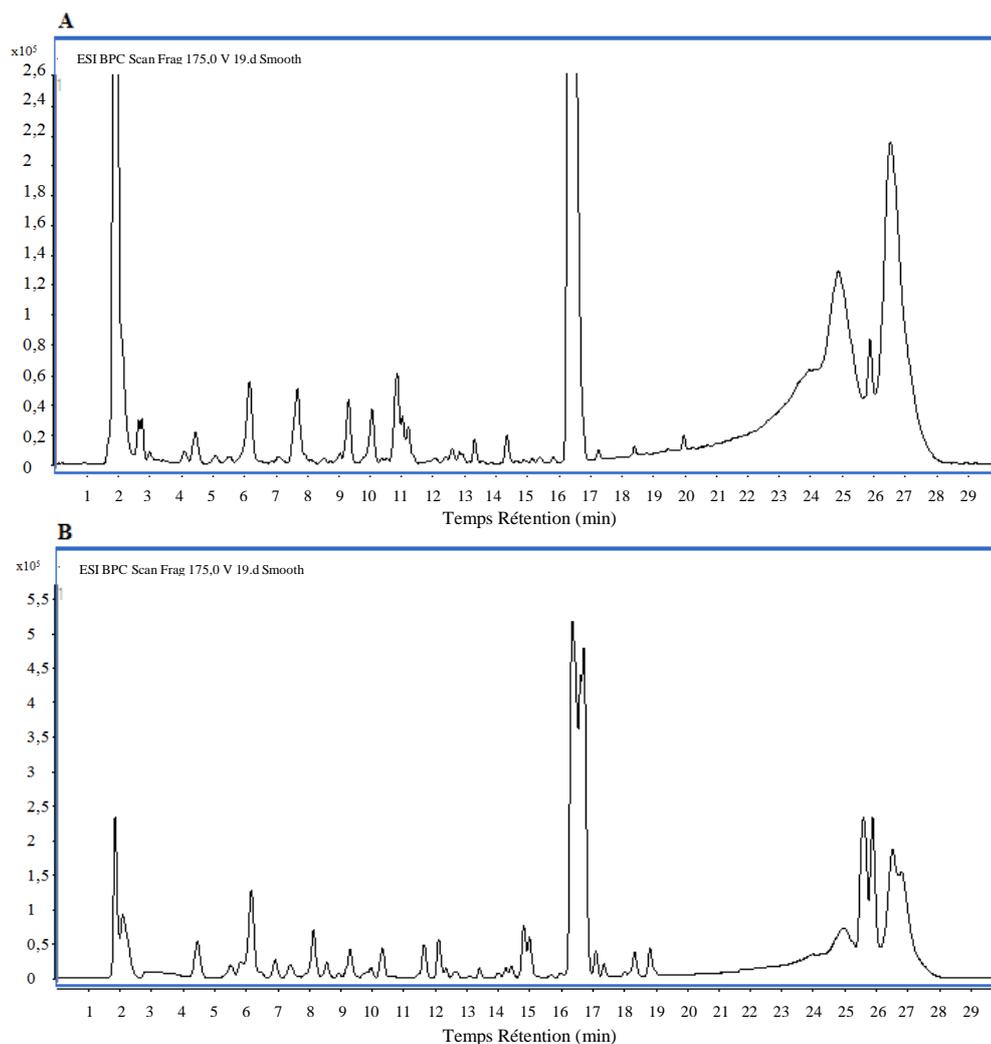
Iravani<sup>1</sup> et Zolfaghari (2011) ont rapporté que l'extrait de l'écorce de *Pinus pinaster* et *Pinus eldarica* est riche en catéchine, en taxifoline et en tanins procyanidiques. D'autre part, Karioti et ses collaborateurs (2009) ont noté la présence de catéchines et des tanins catéchiques dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Pinus pinaster*.

Les résultats de la présente étude sont également soutenus par les travaux de Kuliev et ses collaborateurs (1997) qui ont souligné la richesse de *Quercus robur* en catéchines et en tannins catéchiques. De plus, ils ont pu purifier 20 molécules catéchiques différentes à partir de l'extrait hydro-alcoolique de l'écorce de *Quercus robur*.

Des résultats similaires ont été décrits par Sun et ses collaborateurs (1987) qui ont identifié suite à une analyse par résonance magnétique nucléaire, la catéchine et cinq dimères proanthocyanidiques dans la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait aqueux de *Quercus dentata*.

## **II. Toxicité des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex***

Afin de garantir l'innocuité des extraits étudiés, la toxicité aiguë par voie orale est évaluée sur des souris femelles selon la ligne directrice 420 de l'OCDE (2001). Suite à l'administration par voie orale de 300 et 2000 mg/kg de l'EPH et de l'EQL, les souris sont observées pendant les 4 premières heures et quotidiennement par la suite, pour un total de 14 jours. Toutes les souris ont survécu à l'issue de la période d'observation. De plus, ils n'ont pas montré de symptômes visibles de toxicité (changement de comportement, manque d'appétit, difficultés motrices, dyspnée...etc.). Ces résultats permettent de situer la DL50 des deux



**Figure 14.** Chromatogramme obtenu par HPLC des extraits de *Quercus ilex* (A) et de *Pinus halepensis* (B).

**Tableau 2.** Composés phénoliques identifiés par HPLC dans les extraits de *Quercus ilex* et de *Pinus halepensis*

Composé phénolique	Temps de rétention (min)	(µg/g extrait)	
		<i>Quercus ilex</i>	<i>Pinus halepensis</i>
Ferulic acid	1,07	606,16	-
Gentisic acid	4,40	59,12	-
Catechin	6,16	7359,44	15545,52
4-hydroxybenzoic acid	6,60	335,26	-
Caffeic acid	7,69	2374,82	-
Coumaric acid	9,97	861,34	-
Cinnamic acid	16,04	-	380,94

extraits étudiés au-delà de 2000 mg/kg. Ils servent également de base pour le choix des doses et des concentrations pour les expériences ultérieures.

Les résultats de la présente étude sont en concordance avec les résultats obtenus par Kaouachi et Derouiche (2018), qui ont étudié la toxicité aigue de l'extrait aqueux de *Pinus halepensis*. Ils ont rapporté que des doses de l'ordre de 2000 et 5000 mg/kg de poids corporel administrés à des rats par voie orale n'a pas provoqué de mortalité ou de changement de comportement.

Ratibi et ses collaborateurs (2017) ont obtenu des résultats similaires avec les fruits de *Q. ilex*. Ils ont montré que l'administration de doses allant jusqu'à 5 g/kg de l'extrait aqueux des glands de *Q. ilex* ne donne aucun effet indésirable ou changement de comportement chez la souris durant la période d'observation. De leur part, Watthanachaiyingcharoen et ses collaborateurs (2009) ont étudié l'effet hépatotoxique et néphrotoxique du traitement pendant 14 jours par une formulation traditionnelle constituée majoritairement de poudre de gales de *Quercus infectoria*. Ils ont trouvé à l'issue de leur étude que la partie utilisée de la plante ne présente aucune toxicité par voie orale. Cependant, il est à noter que des cas d'intoxication ont été rapportés chez les ruminants suite à l'ingestion de quantités importantes de jeunes feuilles et de fruits amères d'espèces du genre *Quercus* autres que *ilex* (Flåøyen *et al.*, 1999 ; Sebastian *et al.*, 2007; Talcott, 2018 ). Ces auteurs ont expliqué cette toxicité par la teneur élevée en tanins et au dérivés de leur métabolisme, notamment l'acide gallique, l'acide digallique et le pyrogallol.

### **III. Activité antioxydante des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex***

#### **III. 1. Effet scavenger du radical DPPH**

Les substances pouvant effectuer une réduction soit par l'hydrogène, soit par un don d'électrons, peuvent être considérées comme des capteurs de radicaux et donc des antioxydants. Le degré de décoloration de la solution de DPPH du violet au jaune indique le potentiel de la substance testée à piéger les radicaux libres (Moghaddam *et al.*, 2012) .

Les résultats montrent que les deux extraits exercent une activité scavenger considérable et dose dépendante sur le radical DPPH (figure 15). Cependant, l'extrait de *Q. ilex* avec une  $IC_{50} = 5,67 \mu\text{g/ml}$  est significativement plus puissant ( $p < 0,05$ ) que l'extrait de *P. halepensis* qui a donné une  $IC_{50}$  de  $18,87 \mu\text{g/ml}$  (tableau 3).

Les résultats obtenus sont alignés avec des données publiées précédemment qui ont

rapporté une activité scavenger élevée du radical DPPH pour les espèces de *Quercus* (Vinha *et al.*, 2016; Amessis-Ouchemoukh, 2017). Santos et ses collaborateurs (2010) ont testé l'activité de piégeage du radical DPPH par différents extraits préparés à partir du liège de *Quercus suber* et ont rapporté une valeur de IC50 comprise entre 2,79 et 5,84 µg/ml.

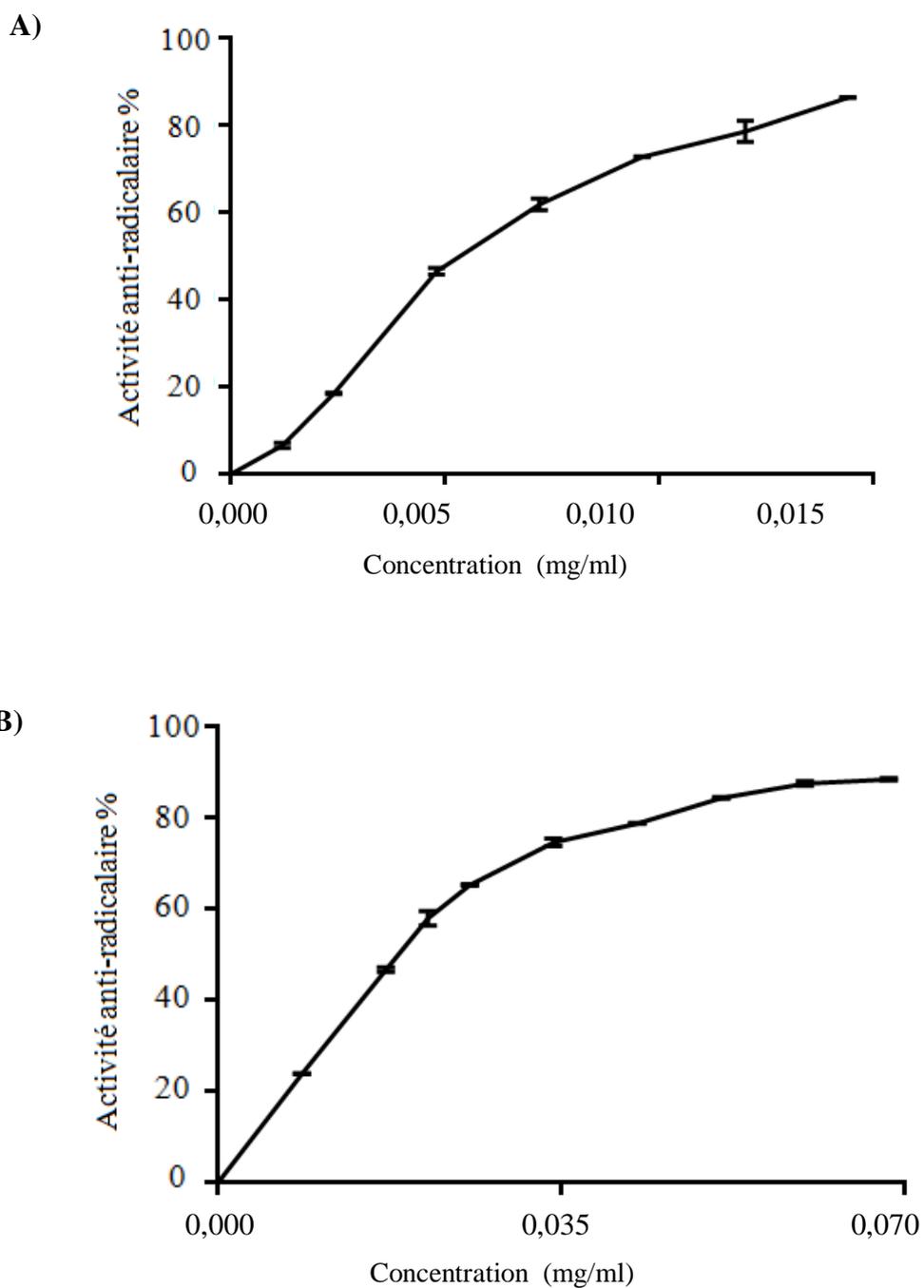
D'autre part Kaouachi et Derouiche (2018) ont montré une activité de scavenger du radical DPPH par l'extrait aqueux de l'écorce de *Pinus halepensis*. Une valeur d'IC50 de 34,92 µg/ml est obtenue. Néanmoins, des comparaisons quantitatives directes ne peuvent être effectuées en raison des différentes parties végétales utilisées et des conditions expérimentales variables.

L'activité de balayage des radicaux par les extraits de *Q. ilex* et de *P. halepensis* pourrait être attribuée aux composés phénoliques présents. En effet, les composés phénoliques sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes, capables de piéger les espèces de radicaux libres et les formes réactives de l'oxygène (Aboul-Enein *et al.*, 2007; Villano *et al.*, 2007). L'effet scavenger des composés phénoliques vis-à-vis des radicaux libres est attribué à leur potentiel rédox faible, les rendant thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres par transfert d'hydrogène ou d'électrons à partir de groupements hydroxyles et par la délocalisation des électrons non appariés conduisant à la formation d'un radical phénoxy stable (Dai *et al.*, 2010).

### III.2. Réduction du radical cation ABTS<sup>•+</sup>

Le test ABTS est souvent utilisé pour mesurer la capacité anti-oxydante des aliments, des boissons et des compléments alimentaires. Il est basé sur la capacité des anti-oxydants à éliminer le radical cation stable ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)], un chromophore bleu-vert ayant une absorption maximale à 734 nm, qui diminue d'intensité en présence d'antioxydants. Les résultats de l'effet piègeur de l'ABTS sont exprimés en tant que capacité antioxydante équivalente au Trolox (TEAC), comme indiqué dans le tableau 3.

De même que pour le test de DPPH, le test ABTS montre que l'extrait de *Q. ilex* exerce une capacité antioxydante meilleure ( $p < 0,05$ ). En fait, l'extrait de *Q. ilex* est quatre fois plus puissant que l'extrait de *Pinus halepensis*. En revanche, Wang ses collaborateurs (1998) ont constaté que certains composés ayant une activité de piégeage du radical ABTS ne montraient pas d'activité de piégeage du DPPH. La présente étude montre la capacité des extraits étudiés à piéger les deux types de radicaux libres (DPPH et ABTS).



**Figure 15.** Effet scavenger du radical DPPH des extraits de *Quercus ilex* (A) et de *Pinus halepensis* (B). Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

### III.3 Pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP)

Le test FRAP est un test simple, rapide et économique. On l'utilisait à l'origine pour mesurer le pouvoir réducteur dans le plasma, mais son utilisation s'est étendue pour évaluer l'activité antioxydante dans d'autres liquides biologiques, aliments et extraits de plantes (Huang *et al.*, 2005). Cette méthode est basée sur le transfert d'électrons qui mesure la réduction du complexe d'ions ferriques ( $Fe^{3+}$ -tripyridyltriazine) en un complexe ferreux ( $Fe^{2+}$ -tripyridyltriazine) de couleur bleuâtre par les antioxydants en milieu acide (Antolovich *et al.*, 2002).

L'extrait de *Q. ilex* montre une capacité de réduction du fer nettement plus élevée ( $p < 0,05$ ) que celle de l'extrait de *Pinus halepensis*. Cet effet va dans le même sens que celui observé avec les tests de DPPH et de l'ABTS (tableau 3). Ces résultats sont en concordance avec ceux rapportés par Belkacem *et ses collaborateurs* (2014) et par Parikh et Patel (2016) qui ont trouvé une relation étroite entre les contenus phénoliques et l'activité antioxydante évaluée par les tests DPPH, ABTS et FRAP.

**Tableau 3.** Effet scavenger du DPPH et de l'ABTS et activité antioxydante par réduction du fer des extraits de *Quercus ilex* et de *Pinus halepensis*.

Extrait	DPPH (IC50 µg/ml)	ABTS (mM Trolox E/mg extrait)	FRAP (mM $FeSO_4$ /mg extrait)
<i>Quercus ilex</i>	5,67 ± 0.09 <sup>b</sup>	4,12 ± 0.90 <sup>a</sup>	8,55 ± 1,52 <sup>a</sup>
<i>Pinus halepensis</i>	18,87 ± 0.2 <sup>a</sup>	1,15 ± 0.27 <sup>b</sup>	1,98 ± 0.22 <sup>b</sup>

L'activité de balayage du DPPH est exprimée en concentration inhibant 50% du radical (IC50). L'activité de balayage de l'ABTS est exprimée en millimole d'équivalent trolox par milligramme d'extrait sec (mMTrolox E/mg d'extrait). Le pouvoir antioxydant par réduction ferrique est exprimé en millimoles d'équivalent  $FeSO_4$  par mg d'extrait (mM  $FeSO_4$ /mg d'extrait). <sup>a</sup> Plus élevé que la valeur <sup>b</sup> de la même colonne ( $P < 0,05$ ). Les valeurs représentent la moyenne ± SD (n = 3).

### III.4. Effet anti-hémolytique

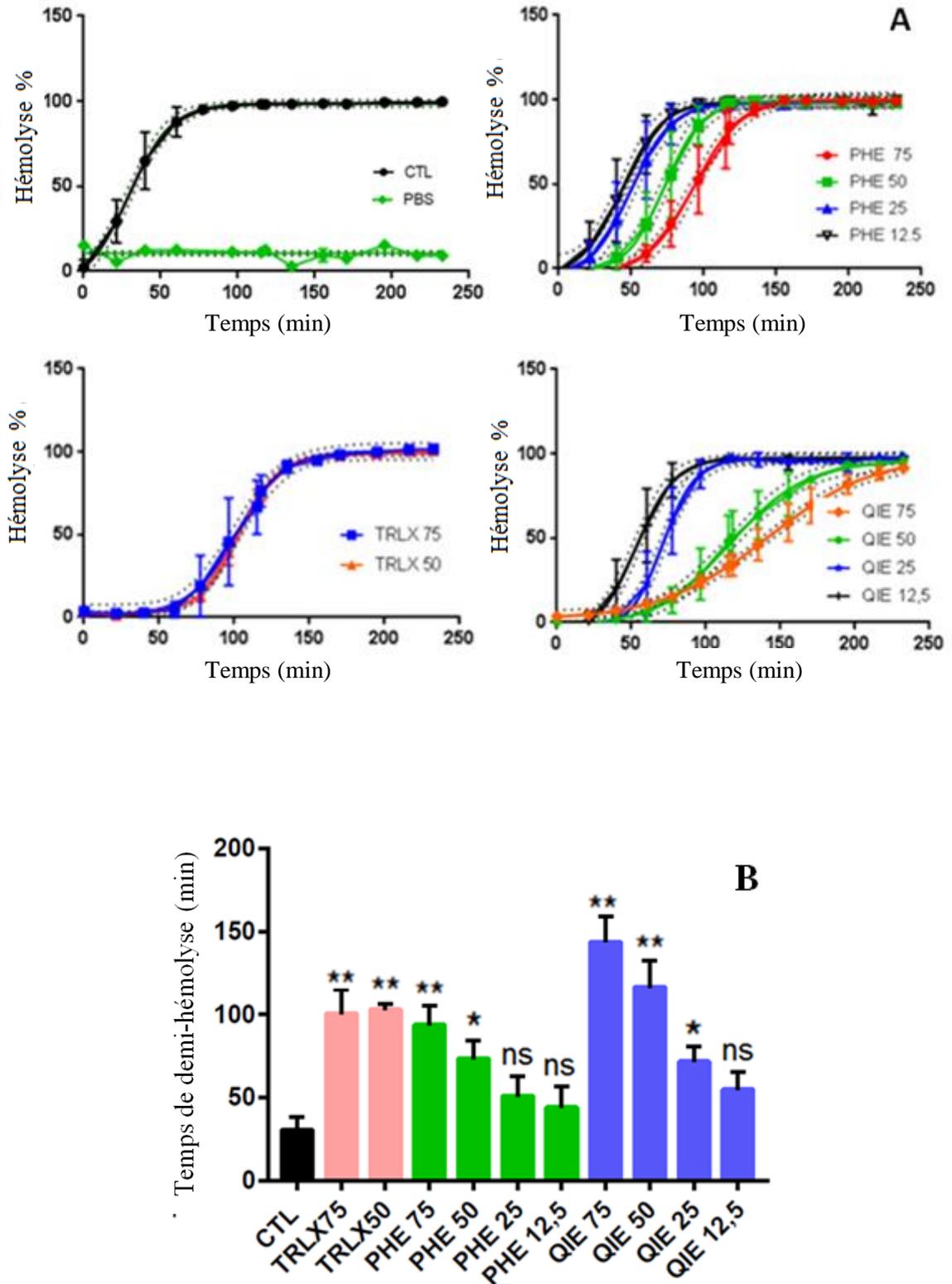
La membrane érythrocytaire est particulièrement sensible aux attaques radicalaires en raison de sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés et de l'implication des érythrocytes dans le transport de l'oxygène moléculaire (García-Becerra *et al.*, 2016). La peroxydation lipidique dans la membrane des érythrocytes humains induite par l'AAPH conduit à des lésions de la membrane puis à l'hémolyse (Aman *et al.*, 2013). Le principe de cet essai est de soumettre les érythrocytes à une agression radicalaire thermo-contrôlée. Normalement, tous les antioxydants présents dans l'extrait seront mobilisés pour protéger l'intégrité des érythrocytes, ce qui retarde l'hémolyse.

L'incubation des érythrocytes uniquement avec les extraits testés n'a pas provoqué d'hémolyse. Ceci indique que les extraits sont non toxiques et non agressifs pour les cellules. La préincubation des érythrocytes avec différentes concentrations de l'extrait pendant 30 min, suivie par le déclenchement de l'agression radicalaire par addition de l'AAPH, conduit à un effet protecteur contre la lyse des globules rouges d'une manière dose dépendante (figure 16). L'extrait de *Pinus halepensis* montre une activité anti-hémolytique importante ( $p < 0,01$ ) aux concentrations de 50 et 75  $\mu\text{g/ml}$ , avec des temps de demi-hémolyse (HT50) de 73,18 et 93,63 min. L'extrait de *Q. ilex* aux mêmes concentrations exerce un effet plus fort (HT50 = 116,46 et 143,6 min, respectivement). Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues avec l'antioxydant standard (Trolox), qui a donné une HT50 de 102,97 et 100,33 min à 50 et 75  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement.

Les résultats obtenus se concordent avec ceux observés avec l'activité de piégeage des radicaux DPPH et ABTS et le pouvoir réducteur antioxydant ferrique. Cette concordance pourrait être partiellement expliquée par la présence de flavonoïdes dans les deux extraits et par la teneur plus élevée en polyphénols de l'extrait de *Q. ilex*, qui est deux fois supérieure à la teneur en polyphénols de l'extrait de *Pinus halepensis*. L'effet protecteur des flavonoïdes et des polyphénols de la membrane des érythrocytes a été déjà signalé (Chaudhuri *et al.*, 2007; De Freitas *et al.*, 2008). Sohretoglu et ses collaborateurs (2012) ont rapporté l'effet protecteur de trois espèces différentes de *Quercus*, à savoir, *Quercus cerris*, *Quercus macranthera* et *Quercus Aucheri* contre la cytotoxicité induite par  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Un effet protecteur significatif a été rapporté à des concentrations de 10 et 25  $\mu\text{g/ml}$ .

Dans une étude conduite par Custodio et ses collaborateurs (2013), il a été rapporté que les extraits méthanoliques des fruits de *Quercus ilex* et *Quercus suber* ont la capacité de piéger les radicaux DPPH et ABTS et prévenir la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène sur la ligné des cellules dopaminergique SH-SY5Y.

De leur part, Grzesik et ses collaborateurs (2018) ont montrée que la catéchine, le composé phénolique majeur de nos deux extraits, est un puissant composé anti-hémolytique. Il a induit une prolongation de la durée de l'hémolyse de plus de 100% à une concentration de 25  $\mu\text{M}$  dans le test de l'hémolyse induite par l'AAPH et à une concentration de 1  $\mu\text{M}$  dans l'hémolyse induite par l'hypochlorite.



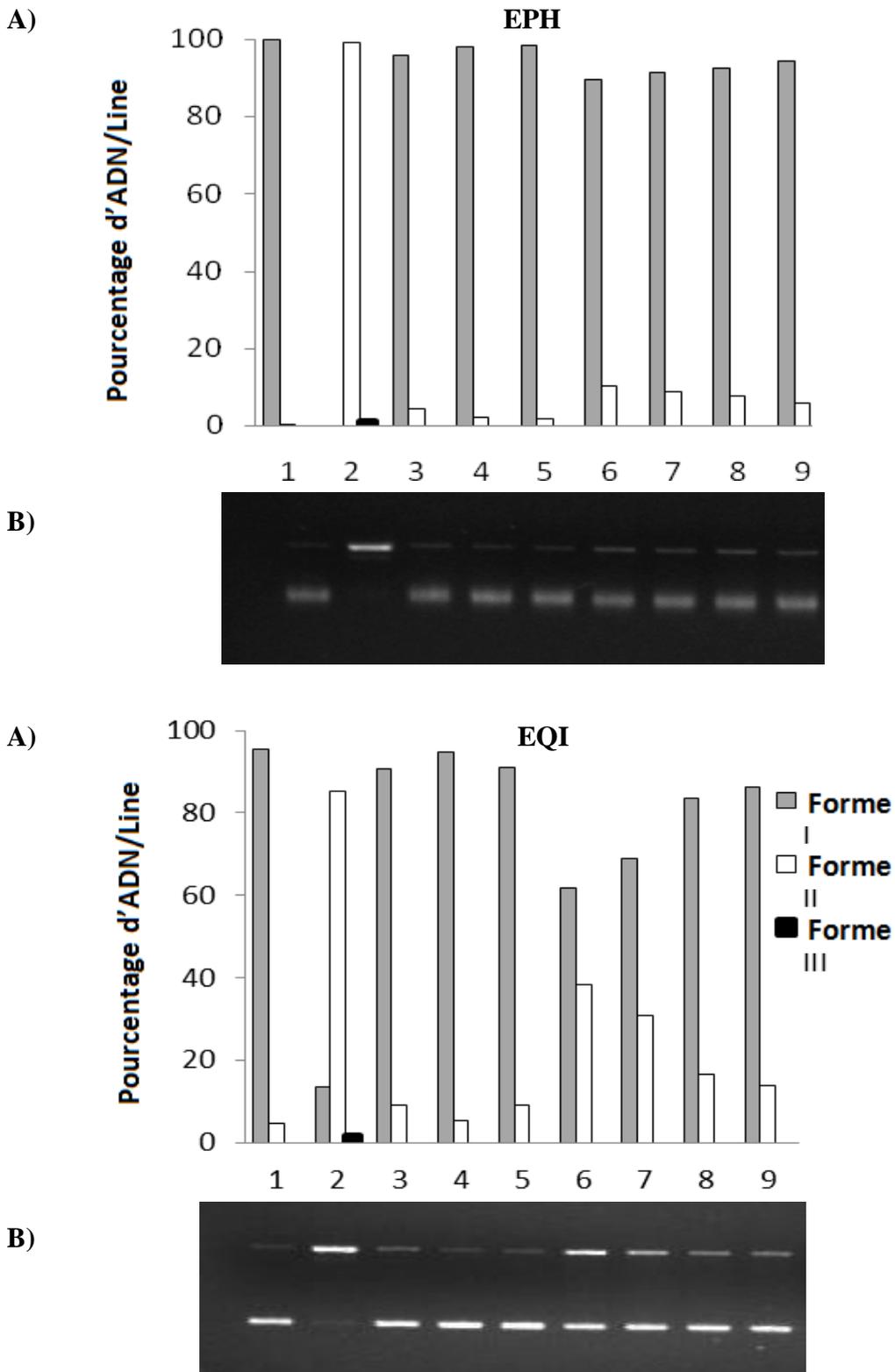
**Figure 16.** Effet inhibiteur des extraits de *Pinus halepensis* (PHE) et *Quercus ilex* (QIE) sur l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH. A : Cinétique de l'hémolyse suivie par mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm. B : Demi-temps d'hémolyse résultant de différents traitements. Contrôle (CTL) : Suspension GR avec AAPH, sans extraits ni Trolox; PBS : Suspension RBC avec PBS au lieu de AAPH. Comparaisons par rapport au control : \*\* : p < 0.01, \* : p < 0.05, ns : non significatif (ANOVA univarié suivi par le test de Dunnett).

### III.5. Effet sur l'oxydation de l'ADN induite par la photolyse du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La photolyse du peroxyde d'hydrogène, induite par les radiations UV, conduit à la formation de radicaux hydroxyles fortement réactifs et fortement oxydants. Les radicaux hydroxyles peuvent endommager tous les composants des molécules d'ADN, telles que les bases de purine, les bases de pyrimidine et le squelette du désoxyribose (Cadet *et al.*, 2015). Par conséquent, la configuration super-enroulée native de l'ADN plasmidique se transforme en formes linéaires circulaires et entaillées ouvertes, ce qui entraîne une modification de leurs propriétés de mobilité électrophorétique sur gel (Yasmeen *et al.*, 2016).

La figure 17A montre le profil électrophorétique de l'ADN en présence et en absence des extraits de *Q. ilex* et de *Pinus halepensis* à différentes concentrations (100, 250, 350 et 500 µg/ml). L'ADN plasmidique présente deux bandes électrophorétiques sur le gel d'agarose (piste 1), la bande proéminente se déplaçant plus rapidement correspond à l'ADN circulaire super enroulé natif (ADNsc) et la bande très faible se déplaçant plus lentement est la forme circulaire ouverte (ADNoc). L'irradiation de l'ADN par les UV en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ligne 2) induit le clivage de l'ADNsc pour donner une bande importante d'ADNoc et une bande ADN linéaire (Lin) faible, indiquant que le radical hydroxyle généré par photolyse du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cause une scission du brin d'ADN. Le traitement par les UV seules ou bien par du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (piste 3 et 4, respectivement) ne cause pas de dommages, comme celui observé dans le traitement combiné (piste 2). L'addition des extraits (pistes 6 à 9) au mélange réactionnel supprime la formation d'ADNlin et induit une protection remarquable de l'ADN circulaire surenroulé natif de manière dose-dépendante. En présence de 100, 250, 350 et 500 µg/ml d'extrait de *Q. ilex*, l'intensité des bandes d'ADNsc (figure 17B) est de 61,82 ; 69,04 ; 83,55 et 86,33% respectivement, par rapport à l'ADN plasmidique non traité. Cependant, celles obtenue en présence des mêmes concentrations de l'extrait de *P. halepensis* sont plus élevées (89,64 ; 91,26 ; 92,53 et 94,41% respectivement), indiquant une meilleur protection.

Cette activité protectrice contre les dommages de l'ADN pourrait être attribuée à la présence de puissants antioxydants dans les extraits. Les composés phénoliques semblent être le meilleur candidat pour cet effet. En effet, Sevgi ses collaborateurs (2015) ont rapporté que les acides phénoliques, notamment l'acide ferulique et l'acide caféique que nous avons trouvés dans l'extrait de *Q. ilex*, possèdent des effets protecteurs sur l'ADN plasmidique de pBR322 contre les effets mutagènes et toxiques des UV et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les études de Piao ses collaborateurs (2013) et de George *et al.* (2017) ont confirmé que les flavonoïdes protègent l'ADN contre les dommages oxydatifs induits par des agents cancérigènes tel que les



**Figure 17.** Effet des extraits de *Pinus halepensis* (EPH) et de *Quercus ilex* (EQI) sur l'oxydation d'ADN induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV. **A** : intensité des bandes quantifiées pour ADN-sc (forme I), ADN-oc (forme II) et ADN-lin (form III). **B** : profil électrophorétique de l'ADN pBluescript M13+ après photolyse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence et en absence des extraits. Ligne 1: ADN control ; Ligne 2: ADN + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV; Ligne 3: ADN + UV; Ligne 4: ADN + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; Ligne 5: ADN + extrait + UV; Lane 6: ADN+ extrait (100 µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV; Ligne 7: ADN + extrait (250 µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV; Ligne 8: ADN + extrait (350 µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV; Lane 9: ADN + extrait (500 µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV.

radiations  $\gamma$  et le benzopyrène dans les cellules leucémiques humaines (HL-60) et les fibroblastes (V79-4) du poumon de l'hamster chinois. La catéchine (présente dans les deux extraits étudiés) possède la capacité de réduire à la fois la rupture de brins simples de l'ADN et les dommages des bases de l'ADN induits par le radical hydroxyle généré par radiolyse (Anderson *et al.*, 2001).

## **IV. Activité anti-inflammatoire des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex***

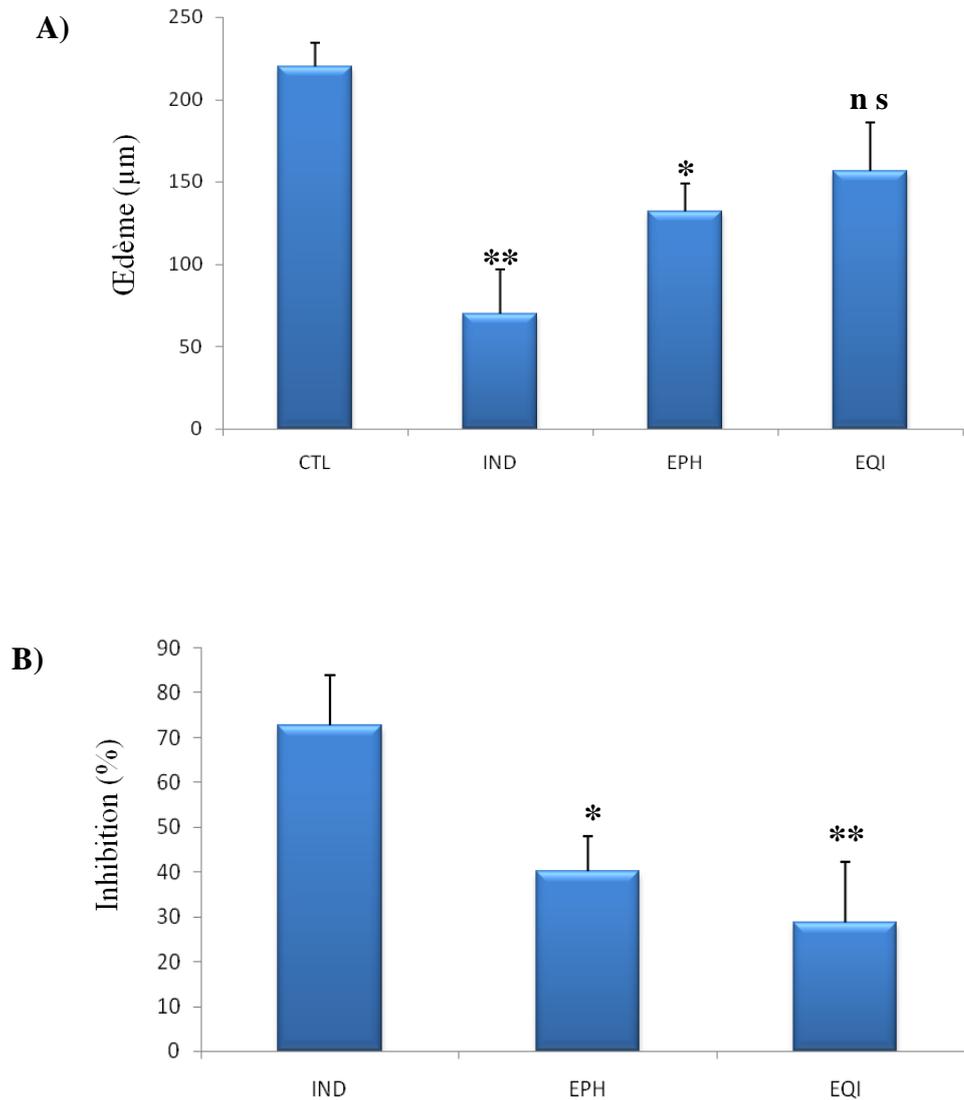
### **IV.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris**

L'œdème de l'oreille induit par le xylène est un modèle expérimental reproductible, qui donne une bonne prédiction pour le criblage des agents anti-inflammatoires (Lua *et al.*, 2006).

Le xylène appliqué sur l'oreille de la souris induit une inflammation cutanée grâce à sa capacité de promouvoir une vasodilatation sur le site où il est appliqué en stimulant la libération de la substance P (SP) et du peptide lié au gène de la calcitonine, des neuropeptides libérés par les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine. Ces médiateurs agissent sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins et les cellules endothéliales pour provoquer une inflammation aiguë caractérisée par une vasodilatation et une exsudation plasmatique. Ceci entraîne une augmentation de l'épaisseur de l'oreille de l'animal (Rotelli *et al.*, 2003 ; Furtado *et al.*, 2016). L'épaisseur de l'œdème atteint son maximum 30 min après l'application du xylène (Lua *et al.*, 2006).

L'application locale de 30  $\mu$ l de xylène seul sur la face interne de l'oreille droite induit l'apparition d'un œdème avec une augmentation de l'épaisseur de l'oreille de  $220 \pm 14,49$   $\mu$ m. Le traitement par l'anti-inflammatoire standard (indométacine) à la dose de 50 mg/kg de poids corporel par voie orale, une heure avant l'induction de l'œdème, conduit à une inhibition significative ( $p < 0.01$ ) de l'œdème comparé à celui des souris du groupe contrôle. La différence de l'épaisseur de l'oreille avant et une demi-heure après l'induction de l'inflammation est de  $70 \pm 26,70$   $\mu$ m, soit 72,72 % d'inhibition (figure 18).

Le traitement oral par 200 mg/kg de l'extrait de *Pinus halepensis*, provoque une atténuation significative ( $p < 0.05$ ) de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin. Un taux d'inhibition de 40,15 % est obtenu avec un œdème caractérisé par une différence d'épaisseur de  $131,66 \pm 17,01$   $\mu$ m. Par ailleurs, le traitement par 200 mg/kg de l'extrait de *Q. ilex* induit une inhibition moindre et non significative de l'inflammation de l'ordre 28,78 %. La différence de l'épaisseur de l'oreille avant et après l'induction de l'inflammation est de  $156,66 \pm 29,51$   $\mu$ m.



**Figure 18.** Effet des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Les groupes de souris sont prétraités oralement par l'indométacine (IND) à 50 mg/kg, l'extrait de *Pinus halepensis* (EPH) ou par l'extrait de *Quercus ilex* (EQI) à 200 mg/kg. Le groupe témoin reçoit du NaCl 0.9%. **A** : Différence de l'épaisseur avant et une demi-heure après l'induction de l'œdème. La comparaison est faite par rapport au groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*: p < 0.01, \* : p < 0.05, ns : non significatif. (ANOVA univarié suivi par le test de Dunnett).

La catéchine, le flavonoïde majeur des deux extraits étudiés est sans doute impliqué dans l'inhibition de la formation de l'œdème. Fechtner et ses collaborateurs (2017) ont montré que les catéchines présentes dans le thé vert interfèrent avec la voie de signalisation de l'IL-1 $\beta$  qui régule l'expression des médiateurs pro-inflammatoires et peuvent ainsi inhiber la production d'IL-6, d'IL-8 et de MMP-2 et inhiber sélectivement l'expression de la Cox-2. D'autre part, Pan et ses collaborateurs (2018) ont rapporté que la catéchine peut réduire les niveaux de certains médiateurs pro-inflammatoires tel que l'interleukine-5 et l'interleukine-13 dans le sérum et supprime la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B dans les cellules immunitaires chez les souris. Le NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription qui régule de multiples aspects des fonctions immunitaires innées et adaptatives et qui joue le rôle de médiateur des réponses inflammatoires. Il induit l'expression de divers gènes pro-inflammatoires, y compris ceux codant pour des cytokines et des chimiokines (liu *et al.*, 2017).

Dans l'étude menée par Fikri et ses collaborateurs en 2019, il a été montré que le traitement des rats par l'acide caféique (présent en grande quantité dans l'extrait de *Q. ilex*), a considérablement atténué les marqueurs inflammatoires par une diminution significative des taux de NF- $\kappa$ B et d'IL-1 $\beta$  dans un modèle expérimental de l'arthrite.

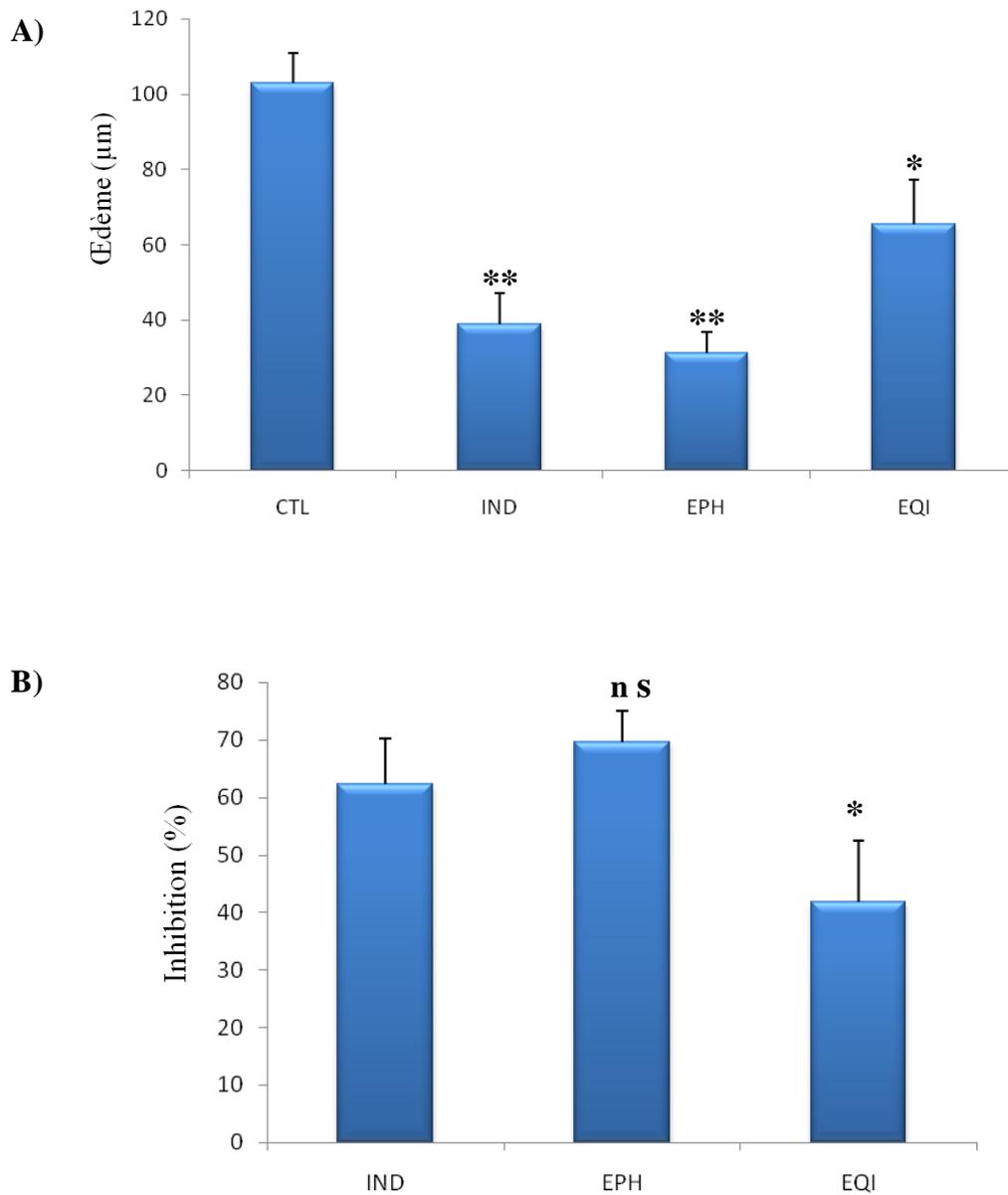
#### **IV.2. Effet sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris**

L'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris est utilisé pour évaluer l'effet anti-inflammatoire local des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex*. L'huile de croton est une substance très irritante qui stimule une réaction inflammatoire dans l'épiderme.

L'application locale de solution d'huile de croton seul sur la face interne de l'oreille droite induit après six heures l'apparition d'un œdème avec une augmentation de l'épaisseur de l'oreille de  $103 \pm 7,89 \mu\text{m}$ .

Chez les souris du groupe traité localement par 0,5 mg/oreille d'indométacine, on a constaté une réduction significative ( $p < 0.01$ ) de l'inflammation comparée à celle développée par les souris du groupe témoin. L'augmentation de l'épaisseur six heures après l'induction de l'inflammation est de  $38,89 \pm 8,24 \mu\text{m}$ , ce qui correspond à une inhibition de 62,24 %

L'application locale de 2 mg/oreille de l'extrait de *P. halepensis* provoque une atténuation significative ( $p < 0.05$ ) de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin. Un taux d'inhibition de 69,66 % est obtenu avec un œdème caractérisé par une différence d'épaisseur de  $31,25 \pm 5,49 \mu\text{m}$  d (figure 19).



**Figure 19.** Effet des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. Les groupes de souris sont traités localement par 0,5 mg d'indométacine (IND) et 2 mg d'extrait *Pinus halepensis* (EPH) ou de *Quercus ilex* (EQI). **A** : Différence de l'épaisseur avant et 6 heures après l'induction de l'œdème. La comparaison est faite par rapport au groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n =7). \*\*: p < 0.01, \* : p < 0.05, ns : non significatif (ANOVA univarié suivi du test de Dunnett).

Contrairement aux effets meilleurs de l'extrait de *Q. ilex* observés dans d'autres testes effectués dans la présente étude, une inhibition moins importante mais significative ( $p < 0.05$ ) de l'œdème est observée chez les souris du groupe traité par 2 mg/kg de l'extrait de *Q. ilex* par rapport aux souris du groupe control, soit 41,74 % d'inhibition de l'œdème.

L'application locale de l'huile de croton induit une inflammation aigue sous forme d'un œdème qui augmente l'épaisseur de l'oreille. Cette augmentation atteint son maximum 6 heures après l'application de l'huile de croton (Tubaro *et al.*, 1985). L'œdème est provoqué par une vasodilatation, une infiltration de leucocytes et la libération de plusieurs médiateurs inflammatoires, en plus d'une sur-activation de la MPO, de la xanthine oxydase et de la peroxydation lipidique (Rahman *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). L'effet phlogogénique de l'huile de croton est dû au 12-o-tétracanoilphorbol-13-acétate (TPA) et à d'autres esters de phorbol qu'elle contient (Pagani *et al.*, 2017). Le TPA induit l'inflammation par activation de la phospholipase A2 qui libère l'acide arachidonique à partir de la membrane cellulaire. A son tour, l'acide arachidonique est métabolisé en prostaglandines pro-inflammatoires par la cyclooxygénase 2 (Cox 2), elle-même activée par le TPA (Satyam *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016). Selon Aquila et ses collaborateurs (2009) le TPA stimule l'expression de la cyclooxygénase 2 et de la NO synthase inductible via l'activation de la protéine kinase C (PKC).

D'une manière similaire au résultat du test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène, l'inhibition de l'œdème par l'extrait de *P. hlepensis* est plus importante que celle exercée par l'extrait de *Q. ilex*, et même que celle de l'indométacine utilisée comme anti-inflammatoire standard. L'indométacine agit par inhibition de la cyclooxygénase 1 et 2 et de la production des médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF  $\alpha$ , IL-6 et la PGE2. (Spatafora *et al.*, 1991 ; Nalamachu et Wortmann, 2014)

Ces résultats sont en concordance avec beaucoup de travaux antérieurs rapportés dans la bibliographie. Blazsó et ses collaborateurs ont montrés que le traitement local et l'administration orale de l'extrait riche en procyanidine de *Pinus pinaster* inhibe l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. Dans une étude menée par Tümen et ses collaborateurs (2017), il a été montré que les huiles essentielles de *Pinus pinaster* inhibent l'œdème de l'oreille induit par le TPA chez la souris, Alors que l'extrait hexanique et l'extrait acétonique de la partie aérienne de la même plante n'ont montré aucun effet sur le même model animal.

Kaur et ses collaborateurs (2004), ont trouvé que l'extrait alcoolique des galles de *Quercus infectoria* possède un effet anti-œdémateux dose dépendant sur l'œdème de l'oreille

induit par le PMA chez la souris et sur l'œdème de la patte induit par la carragénane, l'histamine, la sérotonine et la prostaglandine E2 (PGE2).

La richesse en flavonoïdes et en composés phénoliques des deux extraits serait en partie responsable de l'effet anti-œdémateux de ces extraits. En effet, Castejon et ses collaborateurs (2019), ont montré que l'extrait riche en polyphénols provenant des feuilles matures de *Q. ilex* diminue l'infiltration de neutrophiles, la production d'interleukine-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ , ainsi que la surexpression de protéines pro-inflammatoires, de la cyclooxygénase-2 et de l'oxyde nitrique synthase inductible dans un modèle expérimental de colite aiguë chez le rat. En outre, l'extrait riche en polyphénol des feuilles matures de *Quercus ilex* est capable de bloquer l'activation de la protéine kinase activée par les mitogènes et du facteur de transcription nucléaire kappa B.

La catéchine, composant majeur dans les deux extraits a été montré par Choi et ses collaborateurs (2002) pour sa capacité de réduire significativement l'activité de la phospholipase A2 et de la cyclooxygénase, fortement impliqués dans l'induction de l'œdème par l'huile de croton, en plus de sa réduction de la production de thromboxane A2. Seeram et ses collaborateurs (2003) ont également rapporté l'inhibition de la cyclooxygénase par la catéchine, ceci pourrait expliquer l'effet observé avec l'extrait de *P. halepensis*, qui est plus important que celui de l'indométacine.

## **V. Effet des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* sur les fonctions du neutrophile**

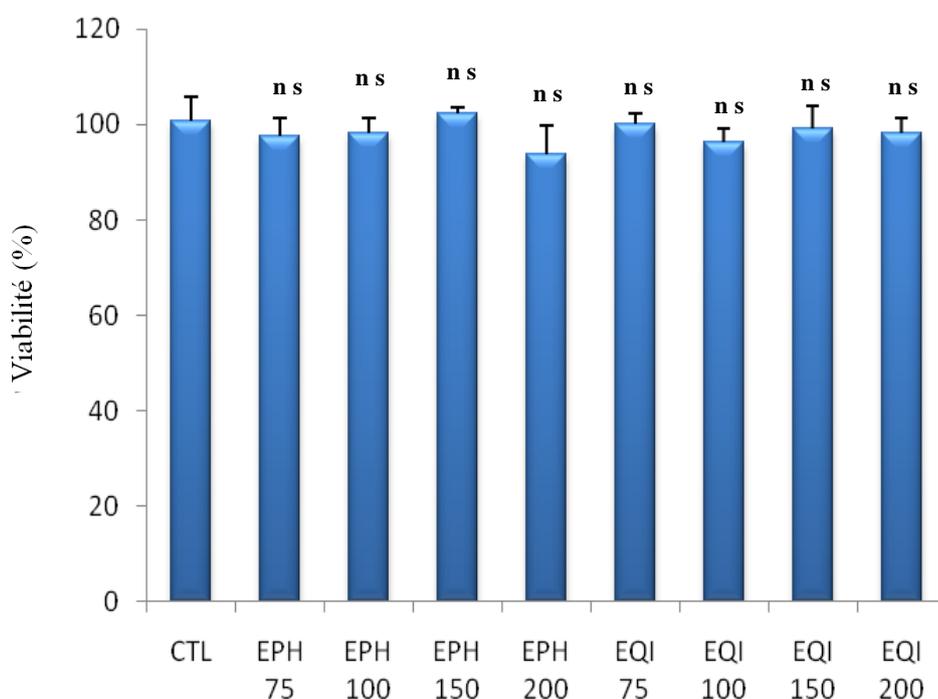
### **V.1. Préparation des neutrophiles humains**

La centrifugation en gradient de densité est une méthode très efficace pour l'isolement des neutrophiles humains à partir du sang total. Une première sédimentation au dextrane est indispensable pour éliminer presque la totalité des globules rouges. La centrifugation en présence de ficoll permettra ensuite de séparer les neutrophiles des autres globules blancs. Étant plus dense que l'isotopaque, les neutrophiles se trouveront en dessous de ce dernier, tandis que les monocytes et lymphocytes avec une densité moindre se trouveront au dessus.

Un rendement considérable avec un nombre variant entre 3 et 5 millions de cellules par ml de sang est obtenu à chaque isolement. La viabilité de cellules isolées dépasse souvent les 95% avec un pourcentage de neutrophiles de plus de 90%.

## V.2. Toxicité des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* sur les neutrophiles

L'incubation des neutrophiles avec les différentes concentrations des extraits de *P. halepensis* et de *Q. ilex* pendant 30 min n'a pas affecté leur viabilité. La valeur minimale de 94% est enregistrée avec l'extrait de *P. halepensis* à une concentration de 200 µg/ml. Une viabilité supérieure à 96% est enregistrée avec le reste des échantillons. Aucune différence significative n'est enregistrée par rapport au contrôle (figure 20). Les extraits étudiés ne présentent donc pas de toxicité envers les neutrophiles humains, du moins aux concentrations utilisées dans ce travail. Il est donc exclu que les effets de ces extraits soient dûs à leur cytotoxicité.



**Figure 20.** Cytotoxicité des extraits de *Pinus halepensis* (EPH) et de *Quercus ilex* (EQI) à différentes concentrations (75, 100, 150 et 200 µg/ml), évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Les PMNs ( $3 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés pendant 30 min en présence des extraits à 37°C. Le pourcentage de viabilité des PMNs est déterminé par rapport au contrôle, considéré comme le 100% de viabilité. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). ns : non significatif. (ANOVA univarié suivie par le test de Dunnett).

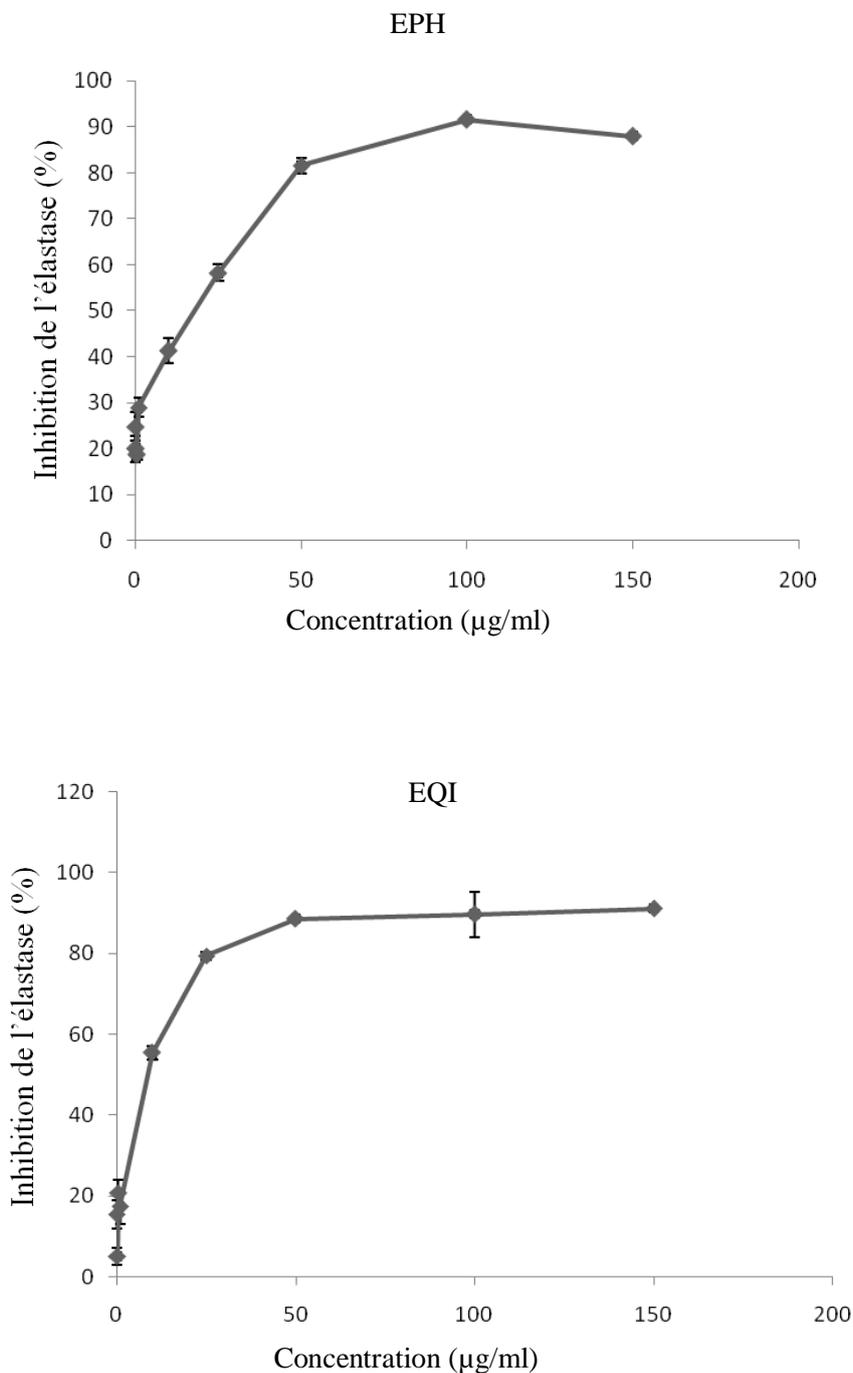
### V.3. Effet sur l'activité de l'élastase

Le fMLP (formyl-Met-Leu-Phe), un tripeptide de synthèse, analogue des produits du métabolisme bactérien, est utilisé dans ce test pour stimuler les neutrophiles humains. C'est un agoniste sélectif des récepteurs FPR et FPR-like 1, localisés sur les neutrophiles, et qui participent aux phénomènes inflammatoires par stimulation de ces cellules dont l'objectif est la neutralisation des agents agresseurs (Dorwad *et al.*, 2015). En effet, à forte concentrations, le fMLP stimule la dégranulation et la flambée respiratoire des neutrophiles, alors qu'à faibles concentrations, il provoque le réarrangement du cytosquelette et l'activation du chimiotactisme du neutrophile (Miettinen *et al.*, 1998).

L'élastase des neutrophiles représente avec les deux autres serines protéases (protéinase 3 et cathepsine G), les principales composantes des granules azurophiles des neutrophiles et qui participent à la voie non oxydante intracellulaire et extracellulaire de destruction des agents pathogènes. Ils agissent en combinaison avec des espèces réactives de l'oxygène pour aider à dégrader les microorganismes engloutis à l'intérieur des phagolysosomes. Ces protéases sont également externalisées sous une forme active lors de l'activation des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires (Korkmaz *et al.*, 2010).

En raison de son implication dans la physiopathologie de plusieurs maladies prévalentes telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive, la fibrose pulmonaire, la bronchectasie et le syndrome de détresse respiratoire aiguë, l'élastase des neutrophiles humains, a été au centre des efforts de développement de médicaments au cours des dernières décennies (Sjo, 2012 ; Polverino *et al.*, 2017)

L'effet inhibiteur des extraits de *P. halepensis* et *Q. ilex* vis-à-vis de l'élastase leucocytaire est évalué par mesure spectroscopique de l'absorbance de son produit, le p-nitroanilide libérée dans le milieu à 405 nm. Les résultats obtenus montrent que la pré-incubation du surnageant enzymatique en présence de 0,05 - 150 µg/ml d'extrait méthanolique de *P. halepensis* et *Q. ilex* inhibe significativement ( $p < 0,05$ ) et de manière dose-dépendante l'activité de l'élastase. Des taux d'inhibition de 81,57 % et 88,58 % pour *P. halepensis* et *Q. ilex* respectivement sont obtenus avec des concentrations 50 µg/ml. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> calculées sont de 19,15 µg/ml et 8,78 µg/ml. Ces résultats indiquent une inhibition plus importante exercée par l'extrait de *Quercus ilex* (figure 21). Ces résultats sont en corrélation avec la teneur en composés phénoliques des deux extraits, ainsi qu'avec les tests de piégeage des radicaux DPPH et ABTS, du pouvoir antioxydant par réduction du fer et de l'activité anti-hémolytique exercée par les deux extraits.



**Figure 21.** Effet des extraits de *Pinus halepensis* (EPH) et *Quercus ilex* (EQI) sur l'activité de l'élastase. Le surnageant contenant l'élastase libérée par les PMNs ( $5,5 \times 10^6$  cellules/ml) stimulés est incubé avec (0-150µg) des extrait pendant 10 min à 37°C. Après l'addition du N-Méthoxy-Suc-(Ala)2-Pro-Val-p-Nitroanilide, l'activité de l'élastase est suivie par mesure de l'absorbance de p-nitroanilide libérée dans le milieu à 405 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'élastase par rapport au contrôle considéré comme le 100% d'activité. Chaque point représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SEM.

De nombreuses études antérieures ont révélé l'inhibition de l'élastase par des extraits de plantes appartenant aux genres *Pinus* et *Quercus*. Moon et ses collaborateurs (2010) ont rapporté que les extraits hydro-alcooliques de *Pinus Parviflora* et *Pinus thunbergii* inhibent l'élastase d'une manière dose dépendante. Junga et ses collaborateurs (2014) ont également obtenu une inhibition significative et dose dépendante de l'activité de l'élastase porcine par l'extrait éthanolique de l'écorce de *Pinus densiflora*. D'autre part, Garrico et ses collaborateurs (2019) ont montré que l'extrait de *Quercus suber* inhibe l'élastase du neutrophile humain et ils ont aussi souligné la contribution de l'acide caféique (l'acide phénolique majeur dans l'extrait de *Q. ilex*) dans cette inhibition.

Les composés phénoliques contenus dans les deux extraits étudiés semblent avoir une grande contribution dans l'effet inhibiteur observé envers l'élastase des neutrophiles. En effet, plusieurs auteurs ont souligné la capacité des composés phénoliques à inhiber l'élastase. Melzig et ses collaborateurs ont étudié l'effet de 40 composés phénoliques dont des flavonoïdes et des composés phénoliques. Ils ont trouvé que les flavonoïdes qui comportent un noyau catéchol, tel que la catéchine fortement présente dans les deux extraits étudiés, exercent une bonne activité anti-élastasique. Ils ont également montré que les esters de l'acide caféique, présents en grande quantité dans l'extrait de *Q. ilex* inhibent significativement l'élastase des neutrophiles humains, ce qui peut expliquer l'effet meilleur observé avec cet extrait.

#### **V.4. Effet sur l'activité de la myéloperoxydase**

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme hémique présente en concentration importantes ( $\pm 5\%$  en poids) dans les granules primaires des cellules polymorphonucléaires neutrophiles. Outre son activité de peroxydase, elle présente une activité de chloration, utilisant le peroxyde d'hydrogène et les ions chlorures pour former l'acide hypochloreux, un oxydant fort, capable de chlorer les molécules. Dans le phagolysosome, la MPO exerce une forte activité antimicrobienne. Par contre, les concentrations anormalement élevées en MPO dans le plasma, dans les liquides biologiques et dans les tissus indiquent une activation importante ou excessive des neutrophiles (Serteyn *et al.*, 2003).

Dans les conditions pathologiques, l'activation persistante du système MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des phagocytes activés peut affecter négativement les tissus. L'acide hypochloreux est capable d'initier des réactions de modification ciblant les lipides, l'ADN et les protéines, y compris l'halogénéation, la nitration et la réticulation oxydative (Malle *et al.*, 2007). Ceci a suscité un intérêt considérable pour le développement d'inhibiteurs de la MPO thérapeutiquement utiles

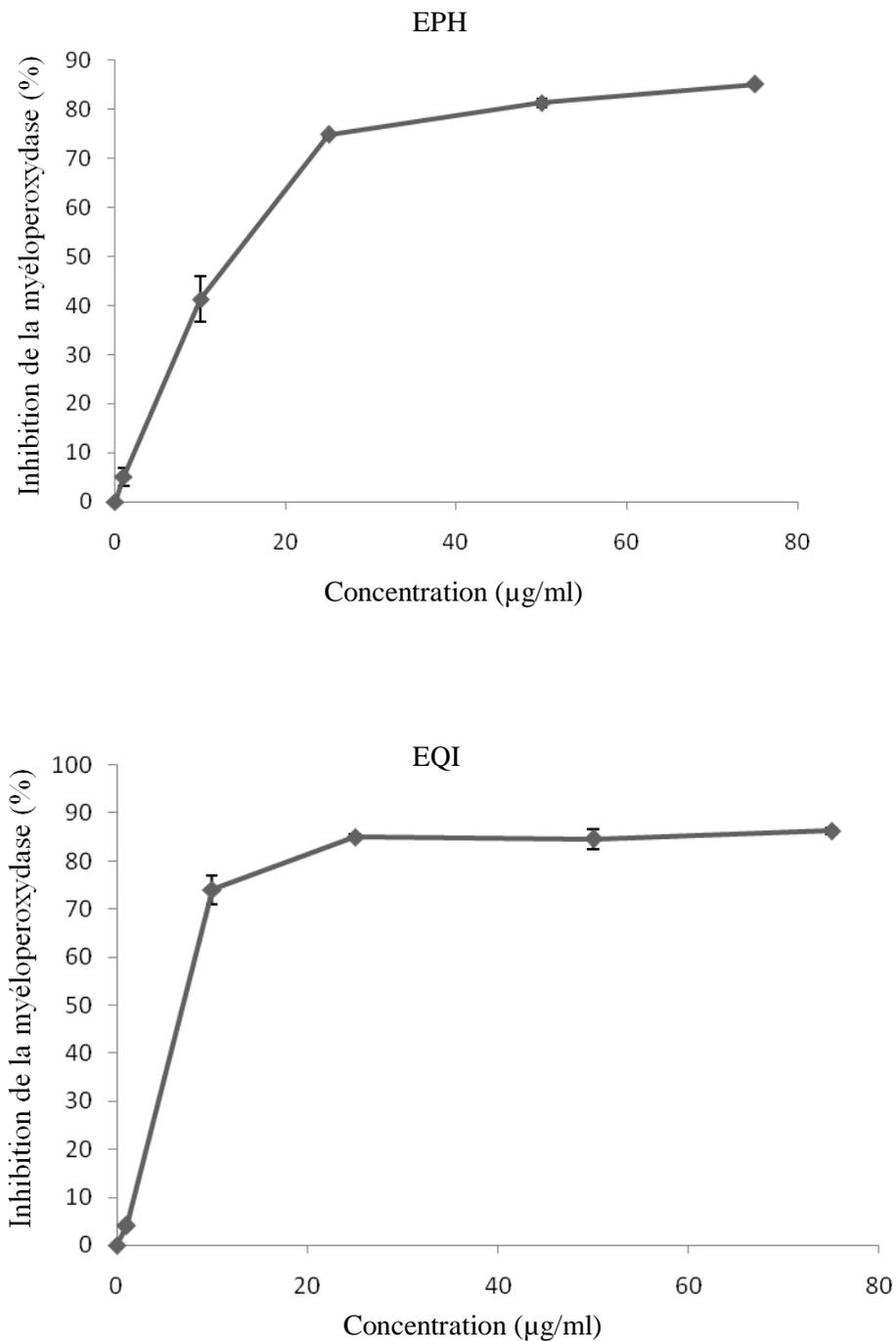
pour le traitement de maladies inflammatoires (de Vargas *et al.*, 2016).

La stimulation du neutrophile par le FMLP conduit à sa dégranulation et permet la libération de la MPO utilisée dans ce test. La préincubation du surnageant enzymatique en présence des extraits étudiés inhibent d'une manière dose-dépendante l'activité de la MPO (figure 22). D'une manière similaire aux résultats de l'activité antioxydante, et ceux obtenus avec le test d'inhibition de l'élastase, l'inhibition exercée par l'extrait de *Q. ilex* envers la myéloperoxydase est plus importante que celle exercée par l'extrait de *P. halepensis* avec des IC50 de l'ordre de 6,21 µg/ml et 15,61 µg/ml respectivement.

Kanavi et ses collaborateurs (2014) ont rapporté que l'extrait hydro-alcoolique ainsi que la poudre des gales de *Quercus brantii* réduisent significativement l'activité de la MPO dans un modèle expérimental de colite murine. Selon Cicero et Colletti (2018), l'extrait de l'écorce de *Pinus pinaster* est un inhibiteur de la MPO des neutrophiles. La même observation est rapportée par Xia et ses collaborateurs (2015), qui ont étudié l'effet du prétraitement par le même extrait sur l'inflammation des poumons induite chez le rat. Shin et ses collaborateurs (2016) ont rapporté dans leur étude menée sur le même extrait, une inhibition de l'expression de la MPO dans les poumons de souris chez lesquelles une bronchopneumopathie chronique obstructive est expérimentalement induite.

Dans leur étude menée sur l'effet du thé vert sur la surproduction du peroxyde d'hydrogène et de l'acide hypochlorique chez les patients atteints d'une insuffisance rénale au cours de la dialyse, Hsu et ses collaborateurs (2007) ont trouvé que les catéchines, composant majeur dans nos deux extraits, réduisent l'activité de la myéloperoxydase d'une manière significative. Tian et ses collaborateurs (2017) ont également rapporté que les catéchines inhibent la myéloperoxydase des neutrophiles et réduisent les dommages causés par l'acide hypochlorique.

D'une autre part, Kato et ses collaborateurs (2003) ont montré que l'acide férulique et l'acide caféique sont de puissants inhibiteurs de la MPO humaine. Ceci pourrait fournir une explication à l'effet meilleur observé avec l'extrait de *Q.ilex* qui contient une quantité considérable d'acide caféique en plus de l'acide férulique.



**Figure 22.** Effet des extraits de *Pinus halepensis* (EPH) et *Quercus ilex* (EQI) sur l'activité de la myéloperoxydase. Le surnageant contenant la MPO libérée par les PMNs ( $5,5 \times 10^6$  cellules/ml) stimulés est incubé pendant 5 min à 37°C en présence des extraits étudiés, de tetraméthyle benzidine et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'activité de myéloperoxydase est détectée par mesure de l'absorbance à 450 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la MPO par rapport au contrôle considéré comme le 100% d'activité. Chaque point représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SEM.

## V.5. Effet sur la flambée respiratoire

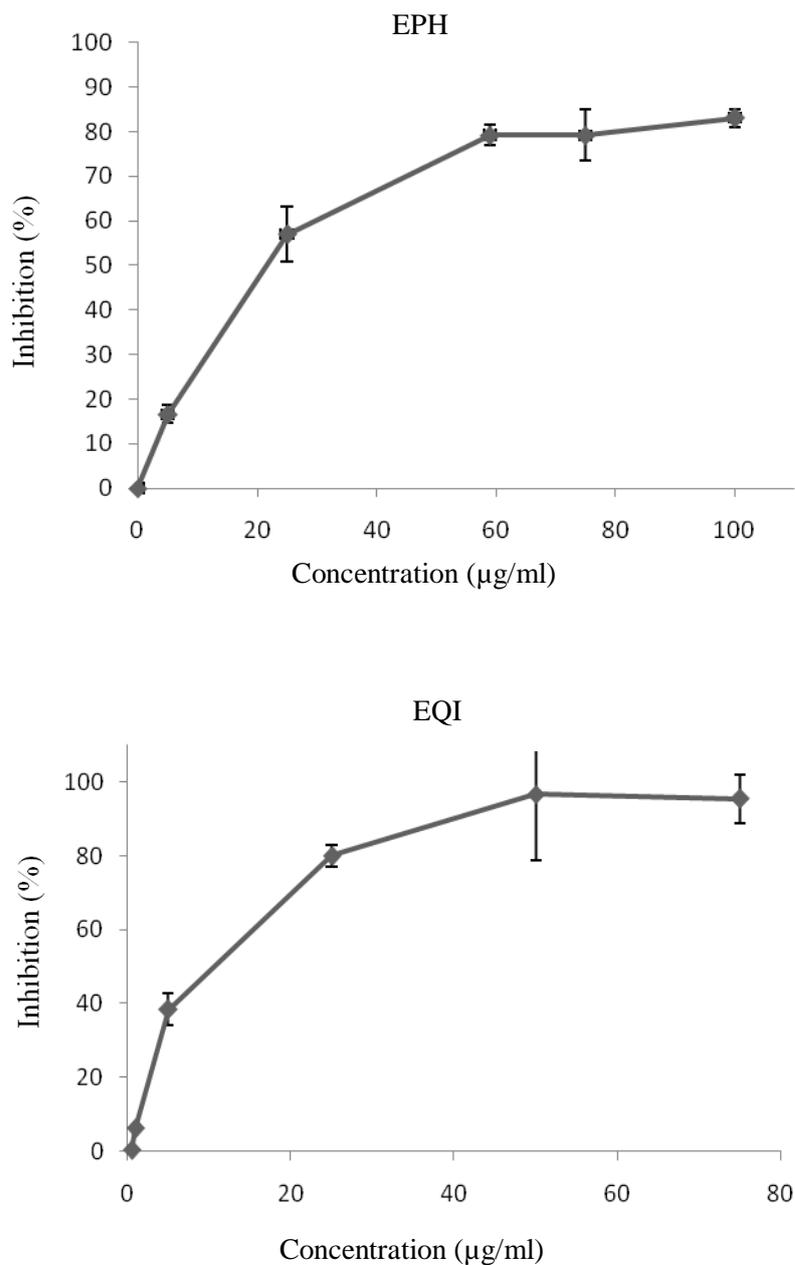
Les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans la défense contre les bactéries et les autres micro-organismes ainsi que dans la régulation de la réponse inflammatoire. Les neutrophiles stimulés activent leur NADPH oxydase pour générer de grandes quantités de superoxyde, qui agit en tant que précurseur du peroxyde d'hydrogène et d'autres espèces réactives de l'oxygène, notamment l'acide hypochloreux qui est une espèce extrêmement microbicide généré par la myéloperoxydase (Winterbourn *et al.*, 2016)

La production d'anion superoxyde par les neutrophiles, suite à leur stimulation par le fMLP, peut être suivie par l'ajout du ferricytochrome C dans le milieu réactionnel. Celui-ci est alors réduit par l'anion superoxyde en ferrocycytochrome C détectable à 550 nm.

La spécificité de la réduction du cytochrome C par l'anion superoxyde est vérifiée à l'aide de la superoxyde dismutase. Cette dernière accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène en empêchant la réduction du ferricytochrome C (Cabanis *et al.*, 1996). L'utilisation de 330 U/ml de superoxyde dismutase inhibe totalement la réduction du cytochrome C, ce qui confirme que cette réduction est due à la présence des anions superoxydes.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *Pinus halepensis* et *Q. ilex* exercent un effet inhibiteur sur la génération du  $O_2^{\cdot -}$  par les PMNs stimulés par le fMLP. La diminution de la production de l'anion superoxyde, au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration des extraits, montre que cette inhibition est dose-dépendante (figure 23). L'extrait *P. halepensis* donne une IC<sub>50</sub> de 21,55 µg/ml, tandis que l'extrait de *Q. ilex* donne une IC<sub>50</sub> de 6,46 µg/ml. Ce résultat confirme la supériorité des effets de *Q. ilex* par rapport à ceux de *P. halepensis* observés dans d'autres tests antioxydants réalisés dans cette étude, ainsi que dans le test d'inhibition de l'élastase et de la myéloperoxydase .

La NADPH oxydase est une enzyme à plusieurs composants qui comprend deux protéines membranaires intégrales, la glycoprotéine gp91 Phox et la protéine adaptatrice p22 (phox), qui forment ensemble le flavocytochrome b558, un hétérodimère qui constitue le cœur de l'enzyme. A l'état de repos, les sous-unités de régulation multidomaines p40P (phox), p47 (phox), p67 (Phox) sont situées dans le cytosol organisé en complexe. L'activation de la NADPH oxydase phagocytaire se fait par une série complexe d'interactions protéiques qui conduisent à la translocation des sous unités cytosoliques vers la membrane (Filip-Ciubotaru *et al.*, 2016)



**Figure 23.** Effet des extraits de *Pinus halepensis* (EPH) et *Quercus ilex* (EQI) sur la flambée respiratoire des PMNs. Les PMNs ( $2,5 \times 10^6$  cellules/ml) sont incubés à 37°C pendant 10 min, en présence de différentes concentrations d'extraits. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la génération du superoxyde en présence d'extrait par rapport au témoin non traité qui représente le 100%. Chaque point représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SEM.

Yousefian et ses collaborateurs (2019) ont évoqué la capacité des composés phénoliques à moduler l'activité de la myéloperoxydase. Nishikawa et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'epigallocatechine gallate (EGCG), l'une des quatre formes de catéchines, inhibe la translocation des sous unités cytosoliques de la NADPH oxydase vers la membrane empêchant ainsi son activation. Vuotto et ses collaborateurs (2003) et Bernatoniene et Kopustinskiene (2018) ont également rapporté l'inhibition du complexe enzymatique NADPH oxydase par les catéchines. De manière totalement contradictoire, Kaur et ses collaborateurs (2008) ont mis en évidence que le prétraitement par l'extrait des gales de *Quercus infectoria* riche en catéchines, permet la restauration de l'intensité de la flambée respiratoire atténuée chez les macrophages par le tert-butyle hydroperoxyde. D'autre part, Carini et ses collaborateurs (2001) ont trouvé que les procyanidines qui sont des tanins condensés à base de catéchine, sont des inhibiteurs beaucoup plus puissants que leur unité constitutive, la catéchine.

L'effet des acides phénoliques sur l'activité du complexe enzymatique de la NADPH oxydase a été investigué par de nombreux auteurs. En effet en 2016, Dudek et ses collaborateurs ont rapporté que les dérivés de l'acide caféique (acide phénolique majeur de *Q. ilex*) inhibent la flambée respiratoire des neutrophiles humains, alors que Wei et ses collaborateurs (2007) ont rapporté une suppression totale de la production des espèces réactives d'oxygène par les neutrophiles stimulés par le fMLP. Les résultats de ces travaux peuvent fournir une explication à l'inhibition plus importante de la NADPH oxydase exercée par l'extrait de *Q. ilex* comparée à celle de l'extrait de *P. halepensis*.

## V.6. Effet sur la phagocytose

L'effet des extraits étudiés sur la phagocytose a été évalué par une méthode qui utilise *C. albicans* comme cible des neutrophiles activés (Ortega *et al.*, 1993). Les cellules de *C. albicans* ingérées sont facilement visualisable au microscope photonique (figure 24 ). Les résultats obtenus montrent une diminution du nombre de *C. albicans* phagocytés par 100 neutrophiles qui représente l'indice de phagocytose (figure 25A). Le pourcentage d'inhibition de l'indice de phagocytose calculé par rapport au control (PMNs et *Candida* sans extraits) est de 94,62%, 74,76% et 67,75% pour les trois concentrations de *P. halepensis* utilisées (25, 50 et 100 µg/ml) respectivement. Des inhibitions moindres avec des pourcentages de 91,12%, 93,45% et 81,77% sont enregistrées avec les mêmes concentrations de *Q. ilex*. Cependant, ces diminutions restent statistiquement non significatives pour les deux extraits. Le pourcentage de neutrophiles qui ont phagocyté au moins une levure (pourcentage de phagocytose) a également diminué suite au traitement par des concentrations de 50 et 100 µg/ml d'extrait de *P. halepensis* et 100 µg/ml de l'extrait de *Q. ilex* (figure 25B).

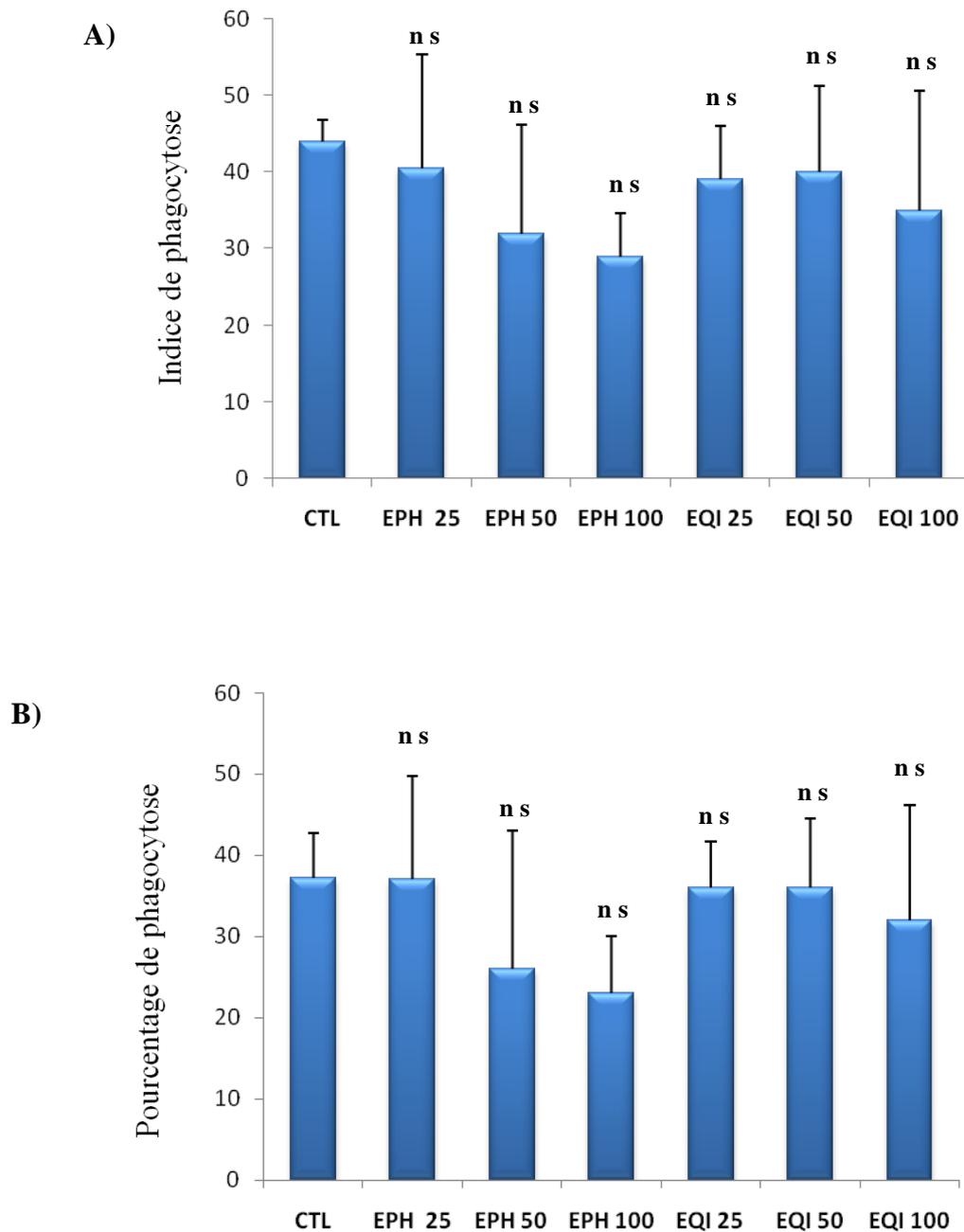
Les pourcentages d'inhibition de la phagocytose calculés pour les trois concentrations citées ci-dessus sont de 69,89 % ; 61,82 % et 86,02 %. Les autres concentrations n'ont induit aucun changement. Toutefois, les diminutions enregistrées restent statistiquement non significatives.

Puisque la phagocytose est un processus indispensable à la lutte contre les organismes pathogènes, l'inhibition de celle-ci chez les neutrophiles qui représentent la première ligne de défense cellulaire, pourrait compromettre la capacité de l'organisme à faire face aux infections (Dumas et Pouliot, 2009). La phagocytose des débris cellulaires qui peuvent aussi être pro-inflammatoires par Les neutrophiles participe également à la phase de résolution de l'inflammation et à la réparation tissulaire (Wang, 2018). De ce fait, l'absence d'inhibition significative de la phagocytose par les deux extraits étudiés, représente un point positif de plus pour ces extraits du point de vue potentiel thérapeutique. En effet, ces extraits ont la capacité de limité la destruction cellulaire en inhibant les enzymes protéolytiques tel que l'élastase et en inhibant la surproduction d'espèces réactives d'oxygène en inhibant la MPO et la flambée respiratoire, sans pour autant affecter le processus de phagocytose chez les neutrophiles.

Kaur et ses collaborateurs (2008) ont montré que le prétraitement des macrophages par l'extrait des gales de *Quercus infectoria* a préservé le seuil normal de l'activité phagocytaire atténué expérimentalement par le tert-butyl hydroperoxyde. De leur part, Shah et ses collaborateurs (2012) ont trouvé que l'extrait de tanins catéchiques extraits de l'écorce *Pinus sylvestris* stimulent la phagocytose d'*Escherichia coli* par les macrophages murins. D'autre part, dans une étude menée par Ganeshpurkar et ses collaborateurs (2014) sur l'effet immuno-modulateur de l'acide férulique, il a été démontré que ce dernier stimule la phagocytose des cellules mortes de *C. albicans* par les neutrophiles humains. Chen et ses collaborateurs (2014) ont également rapporté que l'acide caféique stimule la phagocytose d'*Escherichia coli* par les neutrophiles.



**Figure 24.** Photographie prise sous microscope optique montrant l'ingestion des *C. albicans* par les neutrophiles.



**Figure 25 :** Effet des extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* sur la phagocytose de *C. albicans* par les neutrophiles. **A :** Indice de phagocytose (nombre de *C. albicans* phagocytés par 100 neutrophiles). **B :** Pourcentage de phagocytose (pourcentage de neutrophiles qui ont phagocyté au moins une levure). Les neutrophiles sont pré-incubés avec différentes concentrations d'extraits (25, 50 et 100 µg/ml). Ensuite, un volume 0,5 ml de suspension de *C. albicans* ( $10^6$  cellules/ml) et 50 µl de sérum sont ajoutés, suivie d'une incubation à 37 °C pendant 60 min. Le nombre de *C. albicans* ingéré par les PMN est compté sous microscope. Les résultats sont exprimés en indice de phagocytose (A), ou en pourcentage de phagocytose (B). Chaque colonne représente la moyenne de 3 essais ± SD.

## Conclusion et perspectives

La grande diversité des métabolites secondaires des plantes médicinales fait d'elles un réservoir de substances bioactives qui ne cesse de fournir des alternatives efficaces aux produits de synthèse très utilisés en pharmacie et connus pour leurs effets délétères sur la santé humaine.

Le présent travail a été conduit dans le but de contribuer à la valorisation de notre médecine traditionnelle et à l'exploitation du potentiel de connaissance et d'expérience de nos aïeux, cumulés durant des centaines d'années, en termes de plantes médicinales et de leurs utilisations. Ainsi, nous avons adopté une approche scientifique pour la validation de certaines propriétés thérapeutiques attribuées à deux plantes médicinales largement utilisées dans notre région, le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) et le chêne vert (*Quercus ilex*), d'une part et nous avons essayé d'établir le lien entre les propriétés biologiques observées et la présence de certains métabolites secondaires de ces plantes d'autre part.

L'extraction hydro-alcoolique, connue pour son efficacité dans l'extraction des métabolites secondaires à la fois hydrophobes et hydrophiles, est utilisée dans cette étude pour la préparation de l'extrait de l'écorce des racines de *Quercus ilex* et de l'extrait des jeunes cônes femelles de *Pinus halepensis*. L'étude phytochimique des extraits obtenus a montré qu'ils présentent une teneur considérable en composés phénoliques, en flavonoïdes et en tanins. L'analyse par HPLC a permis d'identifier la catéchine et cinq acides phénoliques, dont l'acide caféique, dans l'extrait de *Quercus ilex*. La catéchine et l'acide cinnamique ont été trouvés dans l'extrait de *Pinus halepensis*.

Dans l'étude de l'activité anti-oxydante *in vitro* de ces deux extraits on a ciblé la capacité de piégeage de deux radicaux libres différents et l'aptitude à réduire le fer. Un potentiel antioxydant considérable a été montré dans ces tests par les deux extraits étudiés. De plus, il s'est avéré que les deux extraits exercent un effet protecteur contre la peroxydation lipidique dans le model de l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH, avec une augmentation dose dépendante du temps de demi-hémolyse. Les extraits étudiés présentent également de bonnes activités de protection de l'ADN vis-à-vis de l'oxydation induite par photolyse sous UV du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

De plus, les extraits des deux plantes exercent des effets anti-œdémateux par application locale dans le model de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton. L'extrait de *Pinus halepensis* possède également un effet anti-œdémateux lorsqu'il est administré par voie orale, sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène.

L'activité anti-inflammatoire a été confirmée par les tests d'évaluation des effets des extraits étudiés sur certaines fonctions du neutrophile humain. Les deux extraits montrent une inhibition significative et dose dépendante de l'activité de l'élastase et de la MPO des neutrophiles et de la flambée respiratoire. Cependant, les extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* n'ont qu'un effet minime et non significatif sur la phagocytose de *C. albicans* par les neutrophiles.

Les résultats de la présente étude montrent que *Quercus ilex* et de *Pinus halepensis* possèdent des effets antioxydant, antihémolytique, genoprotecteur et anti-inflammatoire. Ces deux plantes médicinales pourraient être considérés comme des sources intéressantes d'agents antioxydants et anti-inflammatoires avec des applications pharmacologiques potentielles dans des pathologies dans lesquelles une activation inappropriée des neutrophiles avec surproduction de radicaux libres et d'enzymes protéolytiques sont impliquées.

Toutefois, cette étude nécessite des investigations plus approfondies touchant particulièrement :

- La toxicité subaigüe et chronique qui doivent précéder toute recommandation d'usage en médecine alternative.
- L'isolement des molécules responsables des diverses activités obtenues par ces extraits et comprendre les mécanismes à l'échelle cellulaire et moléculaires, dans l'espoir d'obtenir de nouvelles molécules à effets divers sur les différents effecteurs de l'inflammation.
- Une étude approfondie sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des principes actifs présents dans ces extraits est d'une grande importance pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

## Références bibliographiques

- Abay G, Altun M, Kolda S, Tüfekçi A R, Demirtas I (2015). Determination of antiproliferative activities of volatile contents and HPLC profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Comb Chem High Throughput Screening* 18: 1-11.
- Abdalla S, Pizzi A, Ayed N, Charrier-El Bouthoury F, Charrier F, Bahabri B, Ganash A (2014). Aleppo pine bark tannins. *BioResources*. 9 (2):3396-3406.
- Aboul-Enein HY, Kruk I, Kładna A, Lichszteld K, Michalska T (2007). Scavenging effects of phenolic compounds on reactive oxygen species. *Biopolymers* 3: 222-230.
- Aman S, Moin S, Owais M, Siddiqui M U (2013) Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *Int J Pharm Sci Invention* 2: 55-60.
- Amessis-Ouchemoukh, N, Ouchemoukh, S, Mezianta, N, Idiria, Y, Hernanzc, D, Stincod, C M., Rodriguez-Pulido F J, Heredia F J, Madania K, Luis, J (2017). Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. *Ind Crops Prod* 95: 6-17. through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis*. 22(8):1189-93.
- Anderson RF, Fisher LJ, Hara Y, Harris T, Mak WB, Melton LD, Packer JE (2001) Green tea catechins partially protect DNA from °OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis*. 22(8):1189-93.
- Ariel A, Fredman G, Sun Y-P, Kantarci A, Van Dyke T E, Luster A D, Serhan C N (2006). Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol*. 7(11): 1209-1216.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Cazin M, Cazin JC, Pinkas M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Drug Res* 46: 1086-1099.
- Becit M, Aydın S, Basaran N (2017). Pycnogenol in Human Health: An Overview. *FABAD J Pharm Sci* .42(2):125-138.
- Belkacem N, Djaziri R, Lahfa F, El-Haci I A, Boucherit Z (2014) Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of various *Punicagranatum* l. Peel extracts from Algeria: A comparative study. *Phytothérapie* 12: 372-379.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.
- Berahou A, Auhmanib A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Gadhi C A (2007). Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark’s extracts . *J Ethnopharmacol* 112: 426-429.
- Bhatt ID, Rawat S, Rawal RS (2013). Antioxidants in medicinal plants. In: S Chandra, H Lata, A Verma (Eds.): *Biotechnology for Medicinal Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 296-326.
- Birben E, Sahiner U M, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 5(1):9-19.
- Birklein F, Schmelz M (2008). Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*. 437:199-202.
- Blain H, Jouzeau J.Y, Netter P, Jeandel C (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev Med Interne*. 21 : 978-88.
- Bland J S (1995). Oxidants and antioxidants in clinical medicine: Past, present and future potential. *J Nutr Environ Med* 5: 255-280.

- Blazsó G, Gábor M, Rohdewald P (1997). Antiinflammatory activities of procyanidin-containing extracts from *Pinus pinaster* Ait. after oral and cutaneous application. *Pharmazie*. 52(5):380-2.
- Borregaard N, Cowland JB (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*.89:3503-3521.
- Börzsei R, Pozsgai G, Bagoly T, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z (2008). Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neurosci*. 152 : 82-88.
- Botting RM, Botting JH (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clin Drug Investig* .19 : 1-7.
- Boudy P (1950). Economie forestière nord-africaine : monographies et traitements des essences forestières. 2<sup>ème</sup> Edition Larose. Paris.525 p
- Boulâacheb, N (2010). La résine de *Pinus halepensis* Mill. Usage traditionnel par la population de la petite kabylie (algerie, nord afrique). *Acta Horticulturae*. International symposium on medicinal and aromatic plants. 853:435-438.
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan C N(2014). Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity*. 40: 315-327.
- C Rosales (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*. 9: 113.
- Cadet J, Douki T, Ravanat J L (2015). Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA Radiation. *PhotochemPhotobiol* 91: 140-155.
- Carini M, Stefani R, Aldini G, Ozioli M, Facino RM (2001). Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds inhibit the respiratory burst of activated human neutrophils and lysosomal enzyme release. *Planta Med*. 67(8):714-7.
- Carocho, M, Ferreira ICFR (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 51 : 15-25.
- Charef M, Yousfi M, Saidi M, Stocker P (2008). Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc*. 85(10):921-924.
- Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta P K (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *Int J Biol Macromol* 41: 42-48.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zha L (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*.9 (6): 7204-7218.
- Chen ML, Wu S, Tsai TC, Wang LK, Chou WM, Tsai FM (2014). The caffeic acid in aqueous extract of *Tournefortia sarmentosa* enhances neutrophil phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 36 (6):390-6.
- Choi JH, Chang HW, Rhee SJ (2002). Effect of green tea catechin on arachidonic acid cascade in chronic cadmium-poisoned rats. *Asia Pacific J Clin Nutr*. 11(4): 292-297
- Chowdhury W K, Arbee S, Debnath S, T A A Khan, K Afnan, A S Mahadi, M M Mohib, A Tisha, M A T Sagor, Mohiuddi (2017). Pycnogenol: A Miracle Component in Reducing Ageing and Skin Disorders. *J Clin Exp Dermatol Res*. 8(3).1-8
- Cicero AFG, Colletti A (2018). Handbook of Nutraceuticals for Clinical Use. *Springer*, Switzerland. ISBN 978-3-319-73642-6.
- Cong H, Wang D, Wang X, Cao Y, Ikuyama S, Fan B, Gu J (2018). Pycnogenol protects against diet-induced hepatic steatosis in apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 315: 218-228.

- Cruz-Topete D, Cidlowski JA(2015). One Hormone, Two Actions: Anti and Pro-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulat.*22:20-32.
- Custódio L, Patarra J, Alberício F, Neng NR, Nogueira JMF, Romano A(2013). Extracts from *Quercus sp.* acorns exhibit in vitro neuroprotective features through inhibition of cholinesterase and protection of the human dopaminergic cell line SH-SY5Y from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Ind Crops Prod.* 45:114-120.
- Dai J, Mumper R J (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- D'Andrea G (2010). Pycnogenol: a blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia.* 81(7):724-36.
- De Freitas MV, Netto RM, Da Costa Huss JC, De Souza TMT, de Oliveira CJ, Firmino CB, Penha-Silva N (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro* 22 :219-224
- Demircil F, Bayramiç P, Göger G, Demirci B, Başer KHC (2015). Characterization and Antimicrobial Evaluation of the Essential Oil of *Pinus pinea* L. from Turkey. *Nat. Volatiles & Essent Oils.* 2(2): 39-44.
- DeVargas FS, Almeida PD, de Boleti AP, Pereira MM, de Souza TP, de Vasconcellos MC, Nunez CV, Pohlit A M, Lima ES (2016). Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complement Altern Med.*16:1-8.
- Dhibi M, Mechri B, Brahmi F, Skhiri F, Alsaif MA, Hammami M (2012). Fatty acid profiles, antioxidant compounds and antiradical properties of *Pinus halepensis* Mill. cones and seeds. *J Sci Food Agric.* 92(8):1702-8.
- Diouf N, Stevanovic T, Cloutier A (2009). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chem.* 113: 897-902.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 32(11):1102-15.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM , Stocker P (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem Toxicol* 48: 2599-2606.
- Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG (2015). The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function during Acute Inflammation. *Am J Pathol.* 185(5): 1172-1184.
- Duan J, Kasper DL (2010). Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *J Glycobiol.* 21(4):401-9.
- Dumas A, Pouliot M (2009). Le neutrophile : ennemi ou ami?. *Med Sci* (25):699-704.
- El Kebir D, Filep J G (2017). Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through  $\beta_2$  integrins. *J Clin Exp Dermatol Res* .8:3 1-8.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 127(3):514-25.
- Faurschou M, Borregaard N (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microb Infe.* 5:1317-27.
- Fawole OA , Ndhlala A R, Amoo S O, Finnie J F, Van Staden J (2009) Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. *Ethnopharmacol.*123: 237-243.

- Fechtner S, Singh A, Chourasia M, Ahmed S (2017). Molecular insights into the differences in anti-inflammatory activities of green tea catechins on IL1 $\beta$  signaling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol.* 329:112-120.
- Feghali CA, Wright TM (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* .2:12-26.
- Fekih N, Allali H, Merghache S, Chaïb F, Merghache D, El Amine M, Djabou N, Muselli A, Tabti B, Costa J. (2014) Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pac J Trop Dis.* 4(2): 97-103.
- Fikry EM, Gad AM, Eid AH, Arab HH (2019). Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis. *Biomed Pharmacother.* 110:878-886 .
- Filip-Ciubotaru F, Manciu C, Stoleriu G, Foia L (2016). NADPH oxidase: structure and activation mechanisms (review). note I. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 120(1):29-33.
- Flåøyen A, Handeland K, Arnemo JM, Vikøren T (1999). Toxicity Testing of Leaves from Oak (*Quercus robur*) Harvested in Aust-Agder County, Norway. *Vet Res Commun.* 23(5):317-21.
- Furtado AA, Torres-Rêgo M, Lima MCJS, Bitencourt MAO, Estrela AB, Souza da Silva N, Da Silva Siqueira EM, Tomaz JC, Lopes NP, Silva-Júnior AA, Zucolotto SM, Fernandes-Pedrosa MF(2016). Aqueous extract from *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) leaves and its phenolic compounds have anti-inflammatory activity in murine models of edema, peritonitis and air-pouch inflammation. *J Ethnopharmacol.*192:225-235.
- Galanaud P, Émilie D (2001). Première table ronde : Le syndrome inflammatoire materno-fœtal). Physiologie et physiopathologie de l'inflammation. Masson, Paris.
- Ganeshpurkar A, Ganeshpurkar A, Bansal D, Dubey N(2014). Biological evaluation of ferulic acid as potent immunomodulator: An *in vitro* study. *Int J Green Pharm.*8: 130-4.
- García Villalba R, Espín JC, Tomás-Barberán FA, Rocha-Guzmán NE (2017). Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas. *J Food Compos Anal* 63: 38-46.
- García-Becerra L, Mitjans M, Rivas-Morales C, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Vinardell María, P (2016). Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chem* 194: 1081-1088.
- George VC, Dellaire G, Rupasinghe HPV (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *J NutrBiochem* 45: 1-14.
- Gharzouli K, Khenouf S, Amira S, Gharzouli A (1999). Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytother Res.* 13(1):42-5.
- Giertych M (1991). Developments in plant genetics and breeding. *Elsevier B V.* Volume 3: Genetics of Scots Pine. p: 2-280.
- Gillery P (2001). Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes. *J Soc Biol.*195(4):387-90.
- Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J (2006). Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* 22: 758-766.
- Grzesik M, Napařo K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem* 241: 480-492.
- Gulati O P (2005). The Nutraceutical Pycnogenol: its role in cardiovascular health and blood glucose control. *Biomedical Reviews.* 16: 49-57.

- Hamalainen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E (2007). Anti Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators Inflamm*. Article ID 45673, 10 pages.
- Harfi I, Corazza F, D'Hondt S, Sariban E (2005). Differential Calcium Regulation of Proinflammatory Activities in Human Neutrophils Exposed to the Neuropeptide Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein. *J Immunol*. 15175 (6): 4091-4102.
- Hawkey CJ (2001). COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 15(5):801-820
- Helen L. Wright<sup>1</sup>, Robert J. Moots<sup>2</sup>, Roger C. Bucknall<sup>3</sup> and Steven W. Edwards (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatol*. 49:1618-163
- Houria A, Nadjah R, Belhadj S (2014). Etude morphologique du Chêne vert *Quercus ilex* issu de trois populations d'Algérie : International congress of plant diversity. 1 Janvier 2014. Marrakeche.
- Hsu H P, Wu M S, Yang C C, Huang, K C, Liou S Y, Hsu S M, Chien C T (2007) Chronic green tea extract supplementation reduces hemodialysis-enhanced production of hydrogen peroxide and hypochlorous acid, atherosclerotic factors, and proinflammatory cytokines. *Am J Clin Nutr*. 86:1539-1547.
- Huang D (2018). Dietary Antioxidants and Health Promotion. *Antioxidants (Basel)*. 7(1): 1-9.
- Huang D, Ou B, Prior R L (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841-1856.
- Huet O, Duranteau J (2008). Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libre. *Réanimation*. 17: 387-392.
- Hurst JK (2012). What really happens in the neutrophil phagosome? *Free Radic Biol Med* .53(3): 508-520.
- Iravani S, Zolfaghari B (2011). Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark Extract. *Res Pharm Sci*. 6(1): 1-11.
- Jung HY, Shin JC, Park SM, Kim NR, Kwak W, Choi BH (2014). *Pinus densiflora* extract protects human skin fibroblasts against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs and increasing type I procollagen expression. *Toxicol Rep*. 1: 658-666.
- Kacem R (2013). Phenolic compounds from medicinal plants as Natural anti-elastase products for the therapy of pulmonary emphysema. *J Med Plants Res*. 7(44): 3499-3507.
- Kalyanaraman B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*. 1: 244-257.
- Kaouachi A, Derouiche S (2018). Phytochemical analysis, DPPH antioxidant activity and Acute toxicity of bark aqueous extracts of *Pinus halepensis*. *Res J Chem Environ Sci*. 6 (3): 86-91.
- Karioti A, Bilia AR, Gabbiani C, Messori L, Skaltsa H (2009). Proanthocyanidin glycosides from the leaves of *Quercus ilex* L. (Fagaceae). *Tetrahedron Lett*. 50:1771-1776.
- Kaur G, Athar M, Alam MS (2008). *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chem Biol Interact*. 171(3):272-82.
- Kaur G, Hamid H, Ali A, Alam MS, Athar M. (2004). Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. *J Ethnopharmacol*. 90: 285-292.
- Kaushik D, Kumar A, Kaushik P, Rana AC (2012). Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of *Pinus roxburghii* Sarg. *Adv pharmacol sci*. Article ID 245431.6 pages.
- Khanna RD, Karki K, Pande D, Negi R, Khanna RS (2014). Inflammation, free radical damage, oxidative stress and cancer. *J Microinflammation* 1: 109 1-5

- Khenouf S, Benabdallah H, Gharzouli K, Amira S, Ito H, Kim TH, Yoshida T, Gharzouli A (2003). Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *J Agric Food Chem* 51: 1469-1473.
- Kim JH, Lee KW, Lee MW, Lee HJ, Kim SH, Surh YJ (2006). Hirsutenone inhibits phorbol ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 in cultured human mammary epithelial cells: NF- $\kappa$ B as a potential molecular target. *FEBS Lett.* 580(2):385-92.
- Kizil M, Kizil G, Yavu Z M, Çeken B (2010). Protective activity of ethanol extract of three achillea species against lipid peroxidation, protein oxidation and DNA damage *in vitro*. *Acta Aliment.* 39: 457-470.
- Kizilarıslan C, Sevgi E (2013). Ethnobotanical uses of genus Pinus L. (Pinaceae) in Turkey. *Indian J Tradit Knowle.* 12: 209-220.
- Koehlin-Ramonatxo C (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr Clin Metab.*20(4):165-177.
- Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 30: 620-650.
- Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F (2010). Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. *Pharmacol Rev.*62:726-759.
- Kotroni E, Simirioti E, Kikionis S, Sfiniadakis I, Siamidi A, Karalis V, Vitsos A, Vlachou M, Ioannou E, Roussis V, Rallis M (2019). In Vivo Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of Electrospun Micro/Nanofibrous Patches Loaded with Pinus halepensis Bark Extract on Hairless Mice Skin. *Materials*, 12(16)
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 711: 193-201.
- Kuliev ZA, Vdovin D, Abdullaev ND, Makhmatkulov AB, Malikov VM (1997). Study of the catechins and proanthocyanidins of *Quercus robur*. *Chem Nat Compd.* 33(6): 642-652.
- Kumar RK, Wakefield D (2015) Inflammation: Chronic. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0000944.pub4.
- Kumar S, Pandey AK (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J.* Article ID 162750, 16 pages.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC (2014). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition E-Book. *Elsevier Health Sciences*.
- Kutlu T, Takim K, Çeken B, Kizil M (2014). DNA damage protecting activity and in vitro antioxidant potential of the methanol extract of Cherry (*Prunus avium* L). *J Med Plants Res.*8: 715-726.
- Lacy P (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2(3): 98-108.
- Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu VG, Talla V, Verma V, Kaur N, Nagpal R (2013). Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflamm Allerg Drug Targets.*12(5):349-61.
- Lehucher-Michel M P, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale.*30:1076-1081.
- Li H B, Cheng K W, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.*102: 771-776.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2: 17-23.

- Lloyd MM, Grima MA., Rayner BS, Hadfield KA, Davies MJ, Hawkins CL(2013). Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells. *Free Radic Biol Med.*(65):1352-1362.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8): 118-126.
- Males Z, Pilepic K H, Petrovic L, Bagaric I (2010). Quantitative analysis of phenolic compounds of *Inula candida* (L.) Cass. *Periodicumbiologorum* 112: 687-692.
- Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C (2007). Myeloperoxidase: a target for new drug development?. *Br J Pharmacol* .152: 838-854.
- Martínez-Cayuela M (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.*77: 147 161.
- Mauri A, Di Leo M, De Rigo D, Caudullo G (2016). *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A. (Eds), European atlas of forest tree species. Publ. *Off. EU*, Luxembourg, pp: 22-23.
- Mehrnía, M, Nejadstarrari, T, Assadi, M. Mehregan, I (2013). Taxonomic study of the genus *Quercus* L. Sect. *Quercus* in the Zagros forests of Iran. *Iran J Bot.* 19 (1): 62-74.
- Melzig MF, Löser B, Ciesielski S (2001). Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants.*Pharmazie.* 56(12):967-70.
- Mena P, Calani L, Bruni R, Del Rio D (2015). Diet-Microbe Interactions in the Gut, Academic press. Chapitre 6: Bioactivation of high-molecular-weight polyphenols by the gut microbiome. p:73-101.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T C (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 52(4), 673-751.
- Miettinen HM, Gripenrog JM, Jesaitis AJ (1998). Chemotaxis of Chinese hamster ovary expressing the human neutrophil formyl peptide receptor: role of signal transduction molecules and  $\alpha_5\beta_1$  integrin. *J Cell Scien.*111: 1921-1928.
- Migdal C, Serres M (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci* .27: 405-412.
- Moghaddam A H, Nabavi S M, Nabavi S F, Bigdellou R, Mohammadzadeh S, Ebrahimzadeh M A (2012). Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of *Diospyros lotus* seeds. *Acta Pol Pharm* 69: 687-692.
- Mohammed M S, Osman W J A, Garelnabi E A.E, Osman Z, Osman B, Khalid H S, Mohamed MA (2014). Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *J Phytopharmacol.* 3(4): 275-285.
- Molotkov PI, Patlaj IN (1991). Developments in Plant Genetics and Breeding. *Elsevier B V*. Chapitre 2: Systematic position within the genus *Pinus* and intraspecific taxonomy. p: 31-40.
- Nair M P, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, Kandaswami C(2006). The flavonoid Quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-KB system. *Clin Vaccine Immunol.* 13(3): 319-328.
- Nalamachu S, Wortmann R (2014). Role of indomethacin in acute pain and inflammation management: a review of the literature. *Postgrad Med.* 126(4):92-7.
- Nema R K, Manda S, Yadav S, Yadav S (2009). *Antioxidants: A Review.* *JOCPR.* 1 (1):102-104
- Nishikawa H, Wakano K, Kitani S (2007). Inhibition of NADPH oxidase subunits translocation by tea catechin EGCG in mast cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 362(2):504-9.
- Nordenfelt P, Tapper H (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 90(2):271-284.

- Ortega E, Collazos ME, Maynar M (1993). Stimulation of the phagocytic function of neutrophils in sedentary men after acute moderate exercise. *Eur J Appl Physiol*, 66, 60-64.
- Oschi AM, Pop A (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 97: 55-74.
- Pagani A, Gaeta S, Savchenko AI, Williams CM, Appendino G (2017). An improved preparation of phorbol from croton oil. *Beilstein J Org Chem*.13:1361-1367.
- Pahari S K, Ghosh S, Halder S, Jana M(2016). Role of Coenzyme Q10 in human life Research. *J Pharm and Tech*. 9(6): 635-640.
- Pan Z, Zhou Y, Luo X, Ruan Y, Zhou L, Wang Q (2018). Against NF- $\kappa$ B/thymic stromal lymphopoietin signaling pathway, catechin alleviates the inflammation in allergic rhinitis. *Int Immunopharmacol*. 61: 241-248
- Pandeya A, Rayamajhi S, Pokhrel P, Giri B (2018). Evaluation of secondary metabolites, antioxidant activity, and color parameters of Nepali wines. *Food Sci Nutr*. 6(8):2252-2263.
- Parikh B, Patel V H (2017). Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit: Rayan [*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard]. *FSHW* 6: 10-19.
- Pasquier C (1995). Stress oxydatif et inflammation. *RFL*. 276 : 87-92.
- Pérez-Cano F J, Castell M (2016). Flavonoids, Inflammation and Immune System. *Nutrients*. 8(10): 659
- Phaniendra A, Jestadi D B, Periyasamy L (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 30: 11-26.
- Phanwichien K, Pradermwong A and Kamkaen N, Watthanachaiyingcharoen R (2009). Acute toxicity test of medicinal plants and herbal remedies of aphthous ulcer. *J Health Res*.23 (4): 169-174.
- Piao M J, Kim K C, Chae S, Keum Y S, Kim H S, Hyun J W (2013). Protective effect of fisetin(3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) against  $\gamma$ -irradiation-induced oxidative stress and cell damage. *Biomol Ther*.21: 210-215.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J O (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutr Clin Metabol*.16: 233-239.
- Polverino E, Rosales-Mayor E, Dale GE, Dembowski K, Torres A(2017). The Role of Neutrophil Elastase Inhibitors in Lung Diseases. *Chest*.152(2):249-262.
- Pratt DA, Tallman KA, Porter NA (2011). Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks. *Acc Chem Res*.44(6):458-67.
- Qazi Majaz A, Molvi Khurshid I (2016). Herbal Medicine: A Comprehensive Review International. *J Pharm Sci*. 8 (2):1-5.
- Rahman S, Ansari RA, Rehman H, Parvez S. (2009). Raisuddin, nordihydroguaiaretic acid from creosote bush (*Larrea Tridentata*) mitigates 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammatory and oxidative stress responses of tumor promotion cascade in mouse skin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 11: 1-10.
- Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*.1863(12):2977-2992.
- Roberts RE, Hallett MB (2019). Neutrophil Cell Shape Change: Mechanism and Signalling during Cell Spreading and Phagocytosis. *Int J Mol Sci*. 20(6)1383.
- Rosales C, Uribe-Querol E (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int*. Article ID 9042851, 18 pages.

- Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cardeno A, Aparicio-Soto M, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Lastra CAL.(2012) Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res.* 66: 235-242.
- Rtibi K, Hammami I, Selmi S, Grami D, Sebai H, Amri M, Marzouki L (2017). Phytochemical properties and pharmacological effects of *Quercus ilex* L. aqueous extract on gastrointestinal physiological parameters *in vitro* and *in vivo*. *Biomed Pharmacother.* 94: 787-793
- Sagai M, Bocci V (2011). Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res.* 1 (29):1-18.
- Saibabu V, Fatima Z, Khan LA, Hameed S (2015). Therapeutic potential of dietary phenolic acids. *Adv Pharmacol Sci.* Article ID 823539, 10 pages.
- Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Rapisarda P, Dederen J C (1998). *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* photoprotective effect of red orange extract. *Int J Cosmet Sci* 20: 331-342.
- Salim H, Rimawi W H, Shaheen S, Mjahed A (2019). Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of Extracts from Palestinian Aleppo Pine Seeds, Bark and Cones. *Asian J Chem.* 31(1) 143-147.
- Salvi A, Carrupt P, Tillement J, Testa B (2001) Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochem Pharmacol.* 61(10):1237-1242.
- Sánchez A, Calpena A C, Clares B (2015). Evaluating the oxidative stress in inflammation: role of melatonin. *Int J Mol Sci* 16: 16981-17004.
- Sándor K, Helyes Z, Elekes K, Szolcsányi J (2009). Involvement of capsaicin-sensitive afferents and the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in xylene-induced nocifensive behaviour and inflammation in the mouse. *Neurosci Lett.* 451(3):204-207.
- Santos S A O, Pinto P C R O, Silvestre A J D, Neto CP (2010). Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Ind Crops Prod* 31: 521-526.
- Satoh K, Nagai F, Ono M, Aoki N (2003). Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by the extract of *Stephania cepharantha* HAYATA and bis benzylisoquinoline alkaloid cycleanine, a major constituent. *Biochem Pharmacol.* 66: 379-385.
- Schoroderet M (1992). Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Volume 2. Eds, Office des publications universitaires (Alger), pp : 523-530.
- Sebastian M, Czerwinski SE, Baskin S (2007). Renal toxicity. *Veterinary toxicology. Academic press.* pp: 161-176.
- Seeram NP, Zhang Y, Nair MG (2003). Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. *Nutr Cancer.* 46(1):101-6.
- Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL(2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen Biomater.* 4(1): 55-68.
- Sen S, Chakraborty R (2011). The role of antioxidants in human health. In: Oxidative stress: Diagnostics, prevention, and therapy (ACS symposium series). Silvana A, Hepel M, editors. Washington DC: *American Chemical Society*, Chap1, pp. 1-37.
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann Méd Vét.* 147: 79-93.
- Sesti F, Tsitsilonis OE, Kotsinas A, Trougakos IP (2012). oxidative stress-mediated biomolecular damage and inflammation in tumorigenesis. *In vivo.* 26: 395-402.
- Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C (2015). Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 77:12-21.

- Sghaier T, Ammari Y (2012). Growth and production of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) in Tunisia. *Ecologia mediterranea*. 38(1):39-57.
- Shah V, Bayeta E, Lau B H.S (2002). Pycnogenol Augments Macrophage Phagocytosis and Cytokine Secretion. *Pak J Nutr*. 1 (5): 196-201.
- Shin NR, Ryu HW, Ko JW, Park JW, Kwon OK, Oh SR, Kim JC, Shin IS, Ahn KS (2016). A standardized bark extract of *Pinus pinaster* Aiton (Pycnogenol®) attenuated chronic obstructive pulmonary disease via Erk-sp1 signaling pathway. *J Ethnopharmacol*. 194:412-420.
- Silva GL, Luft C, Lunardelli A, Amaral RH, Melo DA, Donadio MV, Nunes FB, de Azambuja MS, Santana JC, Moraes CM, Mello RO, Cassel E, Pereira MA, De Oliveira JR (2015). Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *An Acad Bras Cienc*. 87:1397-1408.
- Simpson T, Kure C, Stough C (2019). Assessing the efficacy and mechanisms of pycnogenol on cognitive aging from *in vitro* animal and human studies. *Front Pharmacol*. 10: A 1-8.
- Sjö P (2012). Neutrophil elastase inhibitors: recent advances in the development of mechanism-based and nonelectrophilic inhibitors. *Future Med Chem*. 4(5):651-60.
- Sohretoglu D, Ekizoglu M, Kılıç E, Sakar K (2007). Antibacterial and Antifungal Activities of Some Quercus Species Growing in Turkey. *FABAD J Pharm Sci* 32: 127-130.
- Sorg O (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *C R Biol*. 327:649-662.
- Spatafora M, Chiappara G, D'Amico D, Volpes D, Melis M, Pace E, Merendino A (1991). Effect of indomethacin on the kinetics of tumour necrosis factor alpha release and tumour necrosis factor alpha gene expression by human blood monocytes. *Pharmacol Res*. 23(3):247-57.
- Suboj P, Babykutty S, Gopi DRV, Nair RS, Srinivas P, Gopalan S (2012). Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by down regulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF-KB. *Eur J Pharm Sci*. 45:581-591.
- Sun D, Wong H, Foo LY (1987). Proanthocyanidin dimers and polymers from *Quercus dentate*. *Phytochem*. 26(6):1825-1829.
- Süntar I, Tumen I, Ustün O, Keleş H, Akkol E K (2012). Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by *in vivo* and *in vitro* experimental models. *J Ethnopharmacol*. 139: 533-40.
- Talcott P (2018). *Toxicologic problems*. Equine internal medicine. Elsevier B.V.
- Tantray Y R, Wani M S, Hussain A (2017). Genus *Quercus*: An Overview. *IJARSE* 6(8):1880-1886
- Thomas DC (2017). The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunol Lett*. 192:88-96
- Tian R, Ding Y, Peng Y, Lu N (2017). Inhibition of myeloperoxidase- and neutrophil-mediated hypochlorous acid formation *in vitro* and endothelial cell injury by (-)-epigallocatechin gallate. *Agric Food Chem*. 65(15):3198-3203.
- Tiwari U, Servan A, Nigam D (2017). Comparative study on antioxidant activity, phytochemical analysis and mineral composition of the Mung Bean (*Vigna radiata*) and its sprouts. *J Pharmacogn Phytochem* 6: 336-340.
- Tolić M T, Krbavčić I P, Vujević P, Milinović B, Jurčević I L, Vahčić N (2017). Identification of phenolic compound by HPLC-TOF MS. *Pol J Food Nutr Sci* 67: 67-74.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Rivera-Del Valle N, Huang P (2008). Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid Redox Signal*. 10(8): 1343-1374.
- Tümen İ, Akkol EK, Taştan H, Süntar I, Kurtca M (2018). Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (*Pinus*

- pinaster* Ait). *J Ethnopharmacol.* 211:235-246.
- Vennetier M, Ripert C, Brochiéro F, K.Rathgeber CB, Chandiooux O, Estève R (2010). Evaluation de la productivité du Pin d'Alep en région méditerranéenne française. *Biologie et écologie.*5: 503-524.
- Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade Gordon P (2002). Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential pro-inflammatory role for Proteinase-Activated Receptor-4 (PAR-4). *J Immunol.*169: 1467-1473.
- Vergnolle N (2003). The inflammatory response. *Drug Dev Res.*59:375-381
- Villano D, Fernandez-Pachon M S, Moya M L, Troncoso A M, Garcia-Parrilla M C (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta.* 71: 230-235.
- Vinha AF, Barreira JCM, Costa ASG, Oliveira MBPP (2016). A new age for *Quercus* spp. Fruits: Review on Nutritional and Phytochemical Composition and Related Biological Activities of Acorns. *Compr Rev Food Sci F.*15:947-981.
- Vinha AF, Costa A S G, Barreira J C M, Pacheco, Beatriz R, Oliveira P P (2016). Chemical and antioxidant profiles of acorn tissues from *Quercus* spp.: Potential as new industrial raw materials *Ind Crop Prod.* 94: 143-151.
- Visser C E, Tekstra J , Brouwer-Steenbergen J J E, Tuk C W, Boorsma D W, Sampat-Sardjoepersad S C, Meijer S, Krediet R T, Beelen R H J (1998). Chemokines produced by mesothelial cells: huGRO- $\alpha$ , IP-10, MCP-1. *Clin Exp Immunol.* 112(2): 270-275.
- Vonkeman HE, Laar MAV (2008). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Seminars in arthritis and rheumatism.*10:10-16.
- Vuotto ML, Miranda R, Ritieni A, Basile A, Ricciardi L, Di Prisco R, Nicolosi G, Mascolo N (2003). Improvement of (+)-catechin inhibitory activity on human PMN respiratory burst by (+)-3-O-propionyl and (-)-3-O-valeryl substitution. *J Pharm Pharmacol.* 55(3):399-405.
- Wang J (2018). Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.* 371(3): 531-539.
- Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, La Voie E J, Huang T, Ho C (1998). Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869-4873.
- Watson RR (2004). Pycnogenol® and cardiovascular health. *JEBIM.*1: 27-32
- Wei HA, Lian TW, Tu YC, Hong JT, Kou MC, Wu MJ (2007). Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils by caffeic acid and hispidin derivatives isolated from sword brake fern (*Pteris ensiformis* Burm). *J Agric Food Chem.* 55(26):10579-84.
- Weill B, Batteux F, Dhainaut J (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Université (Paris). pp: 12-23.
- Wickramasinghe SN, Erber WN (2011). Normal blood cells. In: Porwit A, Cullough JMC, Erber WN (Eds), Blood and Bone Marrow Pathology. *Churchill Livingstone.* United Kingdom. P: 708.
- Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB (2016). Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem.* 85:765-92.
- Wu P, Ma G, Li N, Deng Q, Yin , Huang R (2015). Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait). *Hassk. Food Chem.* 173:194-202.
- Xia YF, Zhang JH, Xu ZF, Deng XM (2015). Pycnogenol, a compound isolated from the bark of *Pinus maritime* mill, attenuates ventilator-induced lung injury through inhibiting NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response. *Int J Clin Exp Med.* 8(2): 1824-1833.

- Yasmeen S, Gupta P (2016). *In vitro* demonstration of *Dalbergia sissoo* (Indian rosewood) methanolic extracts as potential agents for sunscreens and DNA nick prevention. *Int J Pharm Pharm Sci* 8: 175-81.
- Yousefian M, Shakour N, Hosseinzadeh H, Hayes AW, Hadizadeh F, Karimi G (2019). The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension. *Phytomedicine*. 55:200-213. .
- Zhang H, Tsao R (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 8: 33-42.
- Zhang W, Xiao S, Ahn DU (2013). Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 53(11):1191-1201.



# Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts

[Análisis fitoquímico y efectos antioxidante, antihemolítico y genoprotector de extractos metanólicos de *Quercus ilex* L. y *Pinus halepensis* Mill.]

Hicham Meziti<sup>1\*</sup>, Hamama Bouriche<sup>1</sup>, Seoussen Kada<sup>1</sup>, Ibrahim Demirtas<sup>2</sup>, Murat Kizil<sup>3</sup>, Abderrahmane Senator<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Natural Sciences and Life, University Ferhat Abbas, Sétif 1, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory of Plant Research, Department of Chemistry, Faculty of Science, Uluyazi Campus, Cankiri Karatekin University, Cankiri, Turkey.

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and Arts, University of Dicle, Diyarbakir, Turkey.

\*E-mail: [hicham.meziti@univ-setif.dz](mailto:hicham.meziti@univ-setif.dz), [hicham.meziti@yahoo.com](mailto:hicham.meziti@yahoo.com)

## Abstract

**Context:** *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* are largely used in Algerian folk medicine as a remedy for different health problems.

**Aims:** To determine the phytochemical composition as well as to evaluate the antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex* root bark extract (QIE) and *Pinus halepensis* young ovulate cones extract (PHE).

**Methods:** Methanolic extracts were prepared by maceration. Phenolic compounds and flavonoids were quantified spectrophotometrically and identified by HPLC analysis. *In vitro* antioxidant activity of the extracts was assessed by determining the DPPH and ABTS radicals scavenging activities and ferric reducing/antioxidant power (FRAP). Protective effect of the extracts against AAPH-induced erythrocyte hemolysis was assessed. pBluescript M13 (+) plasmid DNA was used as oxidation target to evaluate DNA protective effect of the extracts.

**Results:** Considerable phenolic compounds and flavonoids contents were found in the studied extracts. Catechin and phenolic acids (4-hydroxybenzoic, caffeic, coumaric, ferulic and gentisic acids) were identified in QIE, while catechin and cinnamic acid were identified in PHE. Both extracts scavenge DPPH radical with IC<sub>50</sub> values of 5.67 µg/mL and 18.87 µg/mL, respectively. Antioxidant capacity against ABTS radical was 4.13 and 1.15 mM Trolox equivalent/mg extract. The two extracts also showed a considerable ferric reducing ability with 1.98 and 8.55 mM FeSO<sub>4</sub>/mg extract, respectively. On the other hand, both extracts exerted a significant protective effect against AAPH-induced erythrocyte hemolysis and DNA protective activities were noticed.

**Conclusions:** *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* extracts are important sources of bioactive compounds possessing important antioxidants, anti-hemolytic and genoprotective effects.

**Keywords:** anti-hemolytic; antioxidant; genoprotection; *Pinus halepensis*; *Quercus ilex*.

## Resumen

**Contexto:** *Quercus ilex* y *Pinus halepensis* se usan en la medicina popular argelina como un remedio para diferentes problemas de salud.

**Objetivos:** Determinar la composición fitoquímica, así como evaluar los efectos antioxidantes, antihemolíticos y genoprotectores del extracto de corteza de raíz de *Quercus ilex* (QIE) y el extracto de conos ovulares de *Pinus halepensis* (PHE).

**Métodos:** Los extractos metanólicos se prepararon por maceración. Los compuestos fenólicos y los flavonoides se cuantificaron espectrofotométricamente y se identificaron mediante análisis de HPLC. La actividad antioxidante *in vitro* se evaluó mediante la determinación de las actividades de captación de radicales DPPH y ABTS y la potencia férrica reductora/antioxidante (FRAP). Se evaluó el efecto protector de los extractos contra la hemólisis eritrocítica inducida por AAPH. El ADN plasmídico pBluescript M13 (+) se usó como diana de oxidación para evaluar el efecto protector de los extractos al ADN.

**Resultados:** En los extractos estudiados se encontraron considerables contenidos de compuestos fenólicos y de flavonoides. La catequina y los ácidos fenólicos (4-hidroxibenzoico, cafeico, cumárico, ferúlico y gentísico) se identificaron en QIE, mientras que la catequina y el ácido cinámico se identificaron en PHE. Ambos extractos eliminaron el radical DPPH con valores de CI<sub>50</sub> de 5,67 µg/mL y 18,87 µg/mL, respectivamente. La capacidad antioxidante contra el radical ABTS fue 4,13 y 1,15 mM de equivalente de Trolox/mg de extracto. Los dos extractos también mostraron una considerable capacidad de reducción férrica con 1,98 y 8,55 mM FeSO<sub>4</sub>/mg, respectivamente. Por otro lado, ambos extractos ejercieron un efecto protector significativo contra la hemólisis eritrocítica inducida por AAPH y se observaron actividades protectoras al ADN.

**Conclusiones:** Los extractos de *Quercus ilex* y *Pinus halepensis* son fuentes importantes de compuestos bioactivos que poseen efectos antioxidantes, antihemolíticos y genoprotectores.

**Palabras Clave:** antihemolítico; antioxidante; genoprotección; *Pinus halepensis*; *Quercus ilex*.

## ARTICLE INFO

Received: February 2, 2019.

Received in revised form: May 24, 2019.

Accepted: May 26, 2019.

Available Online: June 15, 2019.

Declaration of interests: The authors declare no conflict of interest.

Funding: This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. Project Ref: CNEPRU/D01N01UN190120150001.



---

## INTRODUCTION

---

It is commonly recognized that reactive oxygen species (ROS) are involved in a variety of physiological processes, including cellular signal transduction, cell proliferation, differentiation and apoptosis (Bland et al., 1995; Sánchez et al., 2015). In healthy individuals, ROS production is continuously balanced by natural antioxidative defense systems. However, oxidative stress or oxidant/antioxidant imbalance occurs when ROS overwhelm antioxidative defense systems. ROS can react with polyunsaturated fatty acids of cell membranes and induce lipid peroxidation leading to the generation of secondary free radicals, which can directly react with other biomolecules, enhancing biochemical lesions (Phaniendra et al., 2015). Increased formation of oxidized products contributes to several pathologies such as atherosclerosis, ischemia-reperfusion, heart failure, Alzheimer's disease, rheumatic arthritis, cancer, and other immunological disorders (Pincemail et al., 2002).

DNA is also an important target for ROS attacks resulting usually in the induction of oxidatively induced DNA damage and a variety of cell lesions. The accumulation of DNA damage through misrepair or incomplete repair may lead to mutagenesis and consequently transformation, particularly if combined with a deficient apoptotic pathway (Kryston et al., 2011).

An increasing number of studies highlighted the importance of medicinal plants as an easily available and potent sources of safe antioxidants, healthcare supplements and biomolecules that help in preserving good health and combating diseases (Bhatt et al., 2013).

*Quercus ilex* L. (*Fagaceae*), is largely used in Mediterranean countries in folk medicine to treat diarrhea, gastritis ulcer and skin infections (Kennouf et al., 2003; Berahou et al., 2007). *Pinus* species, including *Pinus halepensis* Mill. (*Pinaceae*) are used against rheumatic pain, common cold, bronchitis, cough and wound healing (Süntar et al., 2012; Kizilarslan and Sevgi, 2013).

The present study was designed to evaluate the antioxidant, antihemolytic and DNA protective effect of *Quercus ilex* root bark extract and *Pinus halepensis* young ovulate cones extract.

---

## MATERIAL AND METHODS

---

### Chemicals

All the chemicals used in this study were of analytical/HPLC grade and obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). Solvents and salts of the greatest available chemical purity were purchased from Panreac (Panreac Química SLU, Barcelona, Spain) and VWR/Prolabo (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA).

### Plant material

*Quercus ilex* (root bark) and *Pinus halepensis* (young ovulate cones) were collected from the region of Medjana, in eastern Algeria (GPS coordinates: 36°11'19.2"N 4°40'25.4"E). The plants were identified by Pr. Houssine Laouar, University of Sétif. Voucher specimens (No R. F. 2016/39 and No Z. V. 2016/41) respectively, were deposited at the laboratory of botany in the University of Sétif, Algeria. Plant material was washed and air-dried at room temperature and then reduced to powder.

### Preparation of plant extracts

One hundred grams of the powdered plant material were macerated in 80% aqueous methanol (1:10, w/v) and left overnight under continuous agitation. After filtration, the filtrate was concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland). The resulting methanolic extracts were then lyophilized (Christ Martin, Osterode am Harz, Germany) and kept at -20°C until use.

### Measurement of total phenolic content

The total phenolic contents of *Quercus ilex* Lam and *Pinus halepensis* extracts were measured according to the method described by Li et al. (2007) and Meziti et al. (2017). A volume of 200 µL of diluted sample was added to 1 mL of 1:10 diluted

Folin–Ciocalteu reagent. After 4 min, 800 µL of saturated sodium carbonate solution were added. After 2 hours of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 765 nm using a UV-Visible spectrometer (Specord 200 Plus, Analytik Jena, Jena, Germany). Gallic acid was used for the standard calibration curve. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of dry extract (mg GAE/g extract).

### Measurement of flavonoid content

Aluminum-chloride colorimetric assay was used to determine the total flavonoid contents in the extracts as previously reported by Meziti et al. (2017). Briefly, 1 mL of extracts (0.25-0.5 mg/mL) was mixed with the same volume of 2% aluminum trichloride (AlCl<sub>3</sub>) solution and allowed to stand for 15 min. The absorbance of the mixture was then determined at 430 nm with a UV-Visible spectrometer (Specord 200 Plus, Analytik Jena, Jena, Germany). Quercetin was used for the standard calibration curve. The data were expressed as milligrams of quercetin equivalents per gram of dry extract (mg QE/g extract).

### HPLC analysis

HPLC analysis was performed as described by Abay et al. (2015) and Meziti et al. (2017) The extracts were dissolved in HPLC grade MeOH and then filtered through a PTFE (0.45 µm) filter by an injector to remove particulates. The 1260 Infinity HPLC System (Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A.) was coupled with 6210 Time of Flight (TOF) LC/MS detector (Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A.). Injection volume was 10 µL. Separation was carried out on ZORBAX SB-C18 (4.6 x 100 mm, 3.5 µm) column (Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A.). Mobile phases A and B were ultra-pure water with 0.1% formic acid and acetonitrile, respectively. Flow rate was 0.6 mL min<sup>-1</sup> and column temperature was 35°C. The solvent program was as follow: 0-1 min 10% B, 1-20 min 50% B, 20-23 min 80% B, 23-25 min 0% B; 25-30 min 10% B. Ionization mode of HPLC-TOF/MS instrument was negative and operated with a nitrogen gas temperature of 325°C, nitrogen gas flow of 10.0 L min<sup>-1</sup>, nebulizer of 40 psi, capillary volt-

age of 4000 V and finally, fragmentation voltage of 175 V. Phenolic compound were identified by the retention time of sample chromatographic peaks compared with those of authentic standards using the same HPLC operating condition.

### DPPH radical scavenging activity

Radical scavenging activity of the studied extracts against the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) was evaluated as described by Saija et al. (1998). Aliquots of 37.5 µL of the extracts at different concentrations (01 - 70 µg/mL) were added to 1.5 mL DPPH 100 mM in methanol. The mixture was shaken and left to stand at room temperature for 20 min. The absorbance was measured at 517 nm using a UV-Visible spectrometer (Specord 200 Plus, Analytik Jena, Jena, Germany), and the percentage of radical scavenging activity was calculated as follow:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \left[ \frac{\text{Abs Control} - \text{Abs Sample}}{\text{Abs Control}} \right] \times 100 \quad [1]$$

Where Abs control is the absorbance of the control reaction mixture without the test compounds, and Abs sample is the absorbance of the test compounds.

### ABTS radical scavenging activity

The ability of the studied extracts to scavenge the ABTS radical (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) was evaluated according to the method of Kutlu et al. (2014). ABTS+ radical was generated by a reaction between ABTS (1.7 mM) and 4.3 mM potassium persulfate. The mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 12-16 h before use, and then the ABTS solution was diluted with phosphate buffered saline at pH 7.4 to give an absorbance of 0.7 ± 0.02 at 734 nm. To 2 mL of the ABTS+ solution, 50 µL of different concentrations (0.02 - 1.00 mg/mL) of the extracts were added and the decay in absorbance was followed in a UV-Visible spectrometer (Specord 200 Plus, Analytik Jena, Jena, Germany) for 6 min. at 734 nm. The unit of total antioxidant activity was defined as the concentration of Trolox exerting an equivalent antioxidant activity

and expressed as mmol Trolox equivalent/mg dry extract.

### Ferric Reducing Antioxidant Power assay

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) of the extracts was evaluated following the method of Benzie and Strain (1996). Briefly, the FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) solution in 40 mM HCl and 20 mM iron (III) chloride solution in proportions of 10:1:1 (v/v/v), respectively. Fifty microliters of methanolic solution with different concentrations (0.02 – 0.5 mg/mL) of the extracts were added to 1 mL of the FRAP reagent. The absorbance of the reaction mixtures was then measured using a UV-Visible spectrometer (Specord 200 Plus, Analytik Jena, Jena, Germany) at 593 nm after 4 min of incubation at room temperature. The FRAP reagent alone was used as a blank and an iron (II) sulfate solution (100 – 1000  $\mu$ M) was used for the preparation of the standard curve. Results were expressed as mmol Fe (II)/mg dry extract.

### Animals

Swiss albino mice weighing 25–30 g were brought from the Pasteur Institute of Algeria. They were kept in a climate-controlled environment with a 12 h light/dark cycle (7:00 am to 7:00 pm) at 22°C, with free access to food and water *ad libitum*. Animals were treated in accordance with European Union Guidelines for Animals Experimentation (2007/526/EC). The approval to perform the part of this study that involves animal experiments, respecting ethical consideration, was obtained from the Scientific Council of the Faculty of Natural Sciences and Life, University Setif-1 (Algeria) under the reference: CSF/SNV/18/06.

### AAPH-induced erythrocytes hemolysis

Anti-hemolytic effect of *Quercus ilex* Lam and *Pinus halepensis* extracts was assessed according to the procedure described by Girard et al. (2006). Blood was collected through direct heart puncture from anesthetized mice and then diluted to 2% in physiological buffer (NaCl 125 mM, sodium phosphate 10 mM, pH 7.4). In a 96 well plate, 120  $\mu$ L of

mice erythrocytes suspension (2%) were preincubated with 60  $\mu$ L of different concentrations of the extracts (12.5, 25, 50 and 75  $\mu$ g/mL) or Trolox (50, 75  $\mu$ g/mL) for 30 min. at 37°C. To each well, 120  $\mu$ L of AAPH (100 mM) were then added and the mixture was incubated at 37°C. Free radical chain oxidation was the result of aqueous peroxy radicals generated by thermal decomposition of AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) at 37°C. The kinetic of hemolysis was monitored by measuring optical density decrease at 630 nm, using a 96-well microplate reader (ELX 800, BioTEK instruments, Winooski, VT, USA). Trolox was used as reference while physiological buffer served as the control.

### DNA oxidation induced by the photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

The protective effect of the studied extracts against DNA damage generated by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and ultraviolet (UV) radiations, known as reactive oxygen species generating system was checked on pBluescript M13 (+) plasmid DNA as oxidation target (Kizil et al., 2010). The reaction mixture contained 200 ng of plasmid DNA in phosphate buffer (7.14 mM phosphate and 14.29 mM NaCl, pH 7.4). A final concentration of 2.5 mmol/L of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added with or without 1  $\mu$ L of (100, 250, 350, 500  $\mu$ g/mL) of the extracts. The reaction was initiated by UV irradiation at 300 nm with an intensity of 8000  $\mu$ W cm<sup>-1</sup> and continued for 5 min at room temperature on the surface of a UV transilluminator (BioRad, Hercules, CA, USA). After irradiation, the reaction mixture (10  $\mu$ L) with gel loading dye was placed on 1% agarose gel for electrophoresis (BioRad, Hercules, CA, USA). Electrophoresis was performed at 40 V for 3 h in the presence of ethidium bromide (10 mg/mL). Untreated pBluescript M13+plasmid DNA was used as a control in each run of gel electrophoresis along with partial treatment, i.e., only UV treatment and only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Gels were stained with ethidium bromide and scanned with the Gel-Doc-XR Gel documentation system (BioRad, Hercules, CA, USA). Densitometric analysis was used to quantify the intensity of each DNA band.

## Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SD. The hemolysis sigmoids were fitted by computer analysis Software Graph Pad. Prism (V5.00). Statistical significance of the difference was assessed by a one-way analysis of variance followed by Dunnett's test or by Student's t-test as appropriate. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Total phenolic compounds

Polyphenols are one of the most important groups of secondary metabolites of plants. A number of studies focused on the biological activities of phenolic compounds, which are potential antioxidants and free radical-scavengers (Zhang and Tsao, 2016).

*Quercus ilex* extract showed a high phenolic content ( $490.81 \pm 29.62 \mu\text{g GAE/mg}$  dry extract), which was two folds higher than that found in *Pinus halepensis* extract ( $251.40 \pm 7.07 \mu\text{g GAE/mg}$  dry extract). There are a very few studies in the literature that focused on phenolic content of *Quercus ilex* root and no previous study was carried out on phenolic content of *Pinus halepensis* young ovulate cones. Vinha et al. (2016) showed that the total phenolic contents in the acorn tissues of different *Quercus* species including *Quercus ilex* ranged from 18 to  $32 \mu\text{g GAE/mg}$  extract, which were much lower than the present results. These

differences could be related to the divergence in repartition of phenolic compound between the different part of the plant or different climatic conditions (Males et al., 2010; Tolić et al., 2017).

### Flavonoid content

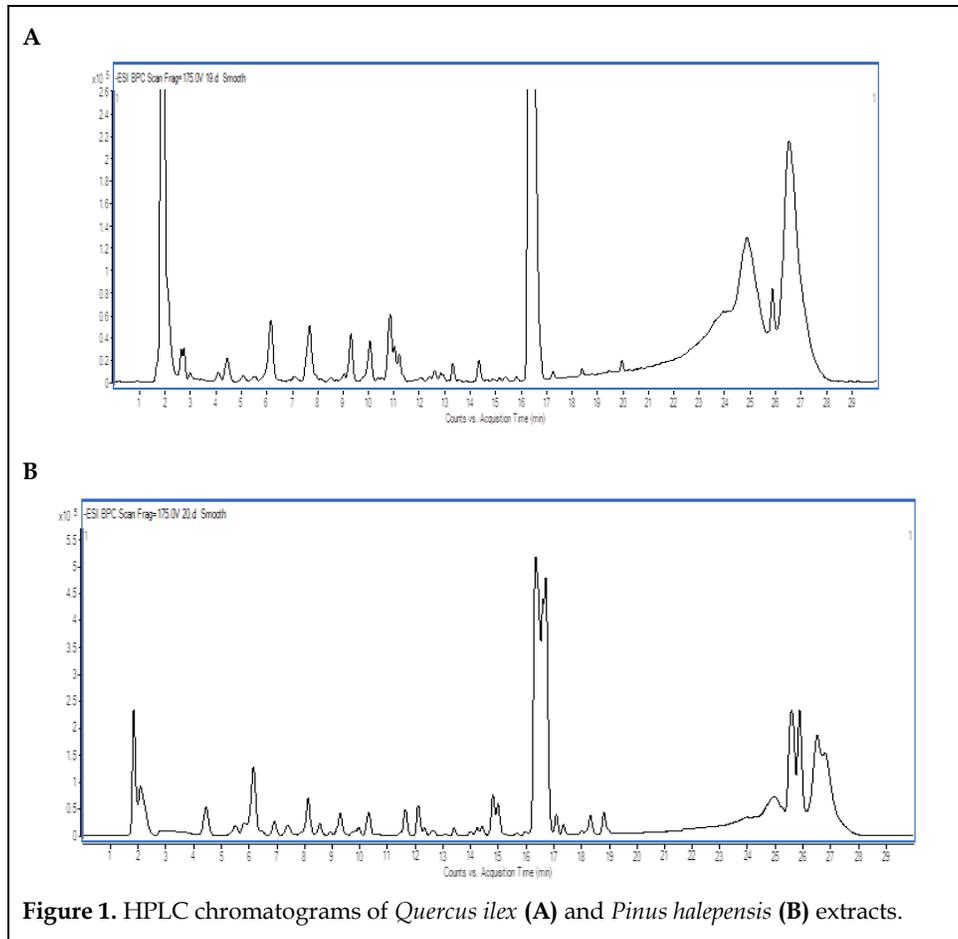
Flavonoids as one of the most diverse and widespread group of natural compounds are probably the most important natural phenolics. These compounds possess a broad spectrum of chemical and biological activities including radical scavenging properties (Djeridane et al., 2010). The results of the present study showed that unlike phenolic content, flavonoids content of *Pinus halepensis* extract ( $3.69 \pm 0.19 \mu\text{g QE/mg}$  dry extract) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of *Quercus ilex* extract ( $3.11 \pm 0.04 \mu\text{g QE/mg}$  dry extract). This result could be due to the proportions of different classes of polyphenols present in the plant extracts.

### HPLC analysis

Results obtained for the polyphenolic composition of the extracts are presented in Table 1. According to the retention time of standards compounds, *Quercus* extracts presented a chemical profile (Fig. 1) composed of six identified phenolic compounds. Catechin was the most important phenolic compound identified followed by caffeic acid. Gentisic and hydroxybenzoic acids were minor compounds in *Quercus ilex* extract.

**Table 1.** Phenolic compounds determined by HPLC-TOF/MS in *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* extracts.

Phenolic compounds	Retention time (min)	<i>Quercus ilex</i> ( $\mu\text{g/g}$ extract)	<i>Pinus halepensis</i> ( $\mu\text{g/g}$ extract)
Ferulic acid	1.076	606.16	-
Gentisic acid	4.4	59.12	-
Catechin	6.16	7359.44	15545.52
4-Hydroxybenzoic acid	6.606	335.26	-
Caffeic acid	7.69	2374.82	-
Coumaric acid	9.97	861.348	-
Cinnamic acid	16.04	-	380.94



These results are partially in concordance with the phytochemical investigation of García-Villalba et al. (2017) who studied the leaf composition of different *Quercus* species and identified, nine phenolic acids (gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid and salicylic acid). They also reported that the predominant flavonoids in all *Quercus* species were catechin and galocatechin.

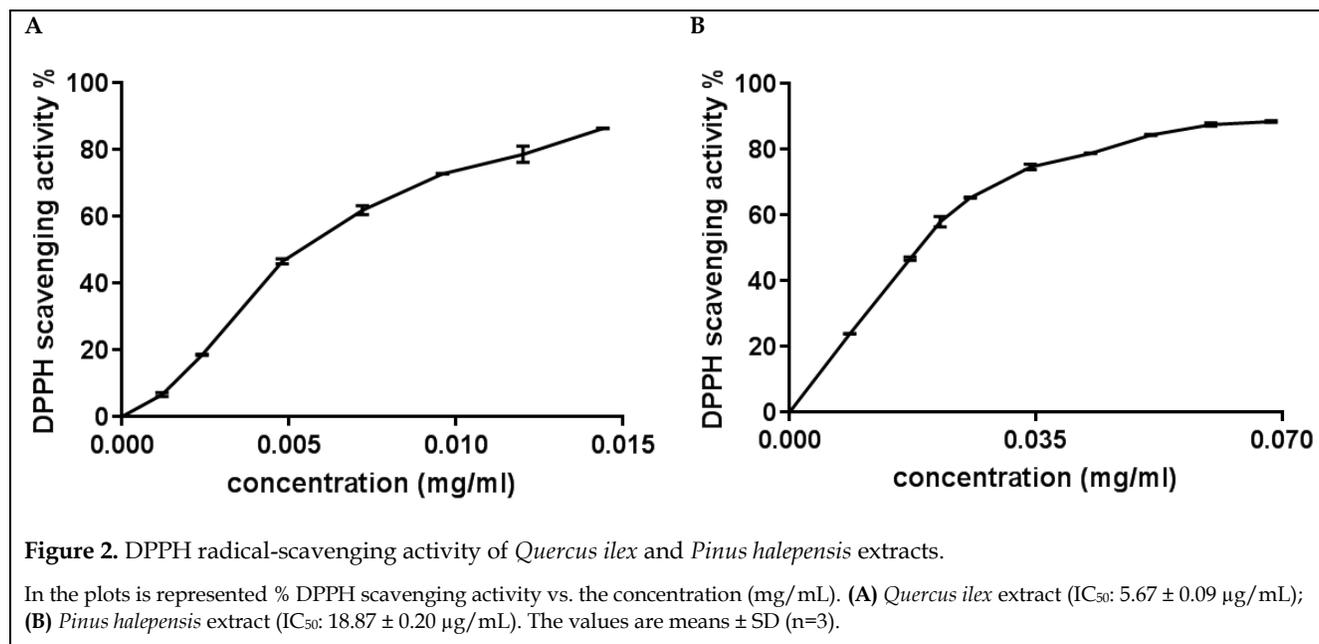
On the other hand, only two phenolic compounds were identified in *Pinus halepensis* extract, catechin which represents the major phenolic compound of the extract and cinnamic acid. In comparison with *Quercus ilex* extract, the concentration of catechin in *Pinus halepensis* extract was twofold higher than in *Quercus ilex* extract. This result could be the explanation of the high flavonoid content obtained by AlCl<sub>3</sub> method.

### DPPH radical scavenging activity

Substances which are able to perform reduction by either hydrogen or electron-donation can be considered as radical scavengers and therefore antioxidants. The color change degree of DPPH radicals from violet to yellow upon reduction indicates the radical scavenging potential of the antioxidant (Moghaddam et al., 2012).

Results showed that both extracts exerted considerable dose-dependent scavenging activity on DPPH radical (Fig. 2). However, *Quercus ilex* extract with IC<sub>50</sub> = 5.67 µg/mL, was significantly more potent (p<0.05) than *Pinus halepensis* extract that gave an IC<sub>50</sub> value of 18.87 µg/mL.

The obtained results are aligned with published data that report high DPPH scavenging activity for *Quercus* species (Vinha et al., 2016; Amessis-Ouchemoukh, 2017). Santos et al. (2010) tested the



scavenging activity of different extracts prepared from cork of *Quercus suber* using DPPH radicals and reported an IC<sub>50</sub> values ranging from 2.79 to 5.84 µg/mL. Nevertheless, direct quantitative comparisons cannot be made due to differences in the experimental conditions.

The radical scavenging activity of *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* extracts is probably attributed to the presence of phenolic compounds. Indeed, phenolic compounds are recognized as potentially antioxidant substances with the ability to scavenge free radical species, and reactive forms of oxygen (Aboul-Enein et al., 2007; Villano et al., 2007). The scavenging effect of phenolic compounds is attributed to their low potential redox making them thermodynamically able of reducing free radicals by a transfer of hydrogen or electron from hydroxyl groups and delocalization of unpaired electron leading to the formation of a stable phenoxyl radical (Dai and Mumper, 2010).

#### ABTS radical scavenging activity

The ABTS assay is often used to measure the antioxidant capacity of foods, beverages and nutritional supplements. It is based on the ability of antioxidants to scavenge the stable radical cation

ABTS•+ [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)], a blue-green chromophore with maximum absorption at 734 nm, which decreases in its intensity in the presence of antioxidants (Kumar et al, 2017). Results of ABTS radical cation scavenging ability were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) as shown in Table 2.

Similarly, to the DPPH assay, ABTS assay revealed that *Quercus ilex* extract exerted a significantly ( $p < 0.05$ ) higher antioxidant capacity. In fact, *Quercus ilex* extract was shown to be fourfold more potent than *Pinus halepensis* extract. In contrast, Wang et al. (1998) found that some compounds, which have ABTS scavenging activity did not show DPPH scavenging activity. The present study further showed the capability of the extracts to scavenge different free radicals (DPPH and ABTS) in different systems.

#### Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

The FRAP assay is simple, fast and cost-effective. It was originally employed to measure reducing power in plasma, but its use has been extended for assessing antioxidant activity in other

biological fluids, foods, and plant extracts (Huang et al., 2005).

This assay is a typical electron transfer-based method that measures the reduction of ferric ion complex ( $\text{Fe}^{3+}$ -tripyrindyltriazine) to the intensely blue colored ferrous complex ( $\text{Fe}^{2+}$ -tripyrindyltriazine) by antioxidants in acidic media (Antolovich et al., 2002).

Compared with *Pinus halepensis* extract, *Quercus ilex* extract showed a significantly higher ferric reducing antioxidant capacity ( $p < 0.05$ ) as it has been recorded in DPPH and ABTS assays (Table 2). These results are in close agreement with those reported by Belkacem et al. (2014) and Parikh and Patel (2017) who found a strong relationship between phenolic contents and antioxidant activity assessed by DPPH, ABTS and FRAP assays.

### Anti-hemolytic activity

Erythrocyte membrane is mostly susceptible to free radicals attack due to its high content of polyunsaturated fatty acids, as well as molecular oxygen transport by hemoglobin (García-Becerra et al., 2016). Lipid peroxidation in human erythrocyte membrane mediated by AAPH, induces mem-

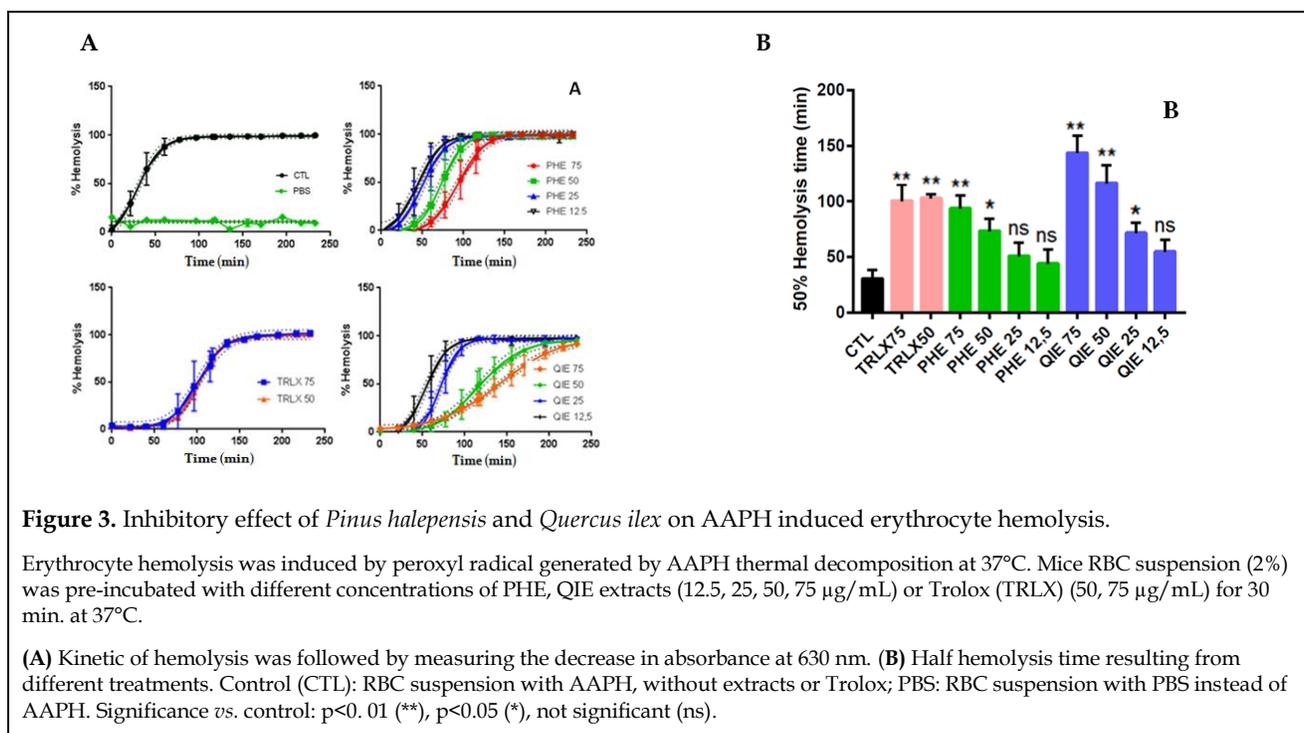
brane damage and subsequent hemolysis (Aman et al., 2013). The principle of this assay is to submit erythrocyte to a thermo-controlled free radical aggression. All families of antioxidant present in the extract are mobilized to fight off the oxidant attack and to protect the integrity of erythrocytes resulting in the delay of hemolysis.

The incubation of red blood cells (RBC) with the tested extracts did not induce hemolysis, indicating that the extracts are nontoxic and harmless for the cells. The preincubation of erythrocytes with different concentrations of the extract for 30 min followed by AAPH challenge resulted in a potent protective effect against AAPH-induced RBC lysis. This protective effect increased in concentration-dependent manner (Fig. 3). *Pinus halepensis* extract showed a significant ( $p < 0.01$ ) antihemolytic activity at the concentrations of 50 and 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , with half hemolysis times ( $\text{HT}_{50}$ ) of 73.18 and 93.63 min, respectively. *Quercus ilex* extract at the same concentrations exhibited a stronger effect ( $\text{HT}_{50} = 116.46$  and 143.6 min, respectively). These values were higher than those obtained with the control (Trolox) that has an  $\text{HT}_{50}$  of 102.97 and 100.33 min at 50 and 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

**Tables 2.** Total phenols, total flavonoid, DPPH scavenging activity, ABTS scavenging activity and ferric reducing-antioxidant power of *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* extracts.

Extract	Total phenols ( $\mu\text{g GAE}/\text{g DE}$ )	Total flavonoids ( $\mu\text{g QE}/\text{g DE}$ )	DPPH ( $\text{IC}_{50} \mu\text{g}/\text{mL}$ )	ABTS ( $\text{mM TE}/\text{mg DE}$ )	FRAP ( $\text{mM FeSO}_4/\text{mg DE}$ )
<i>Quercus ilex</i>	490.81 $\pm$ 29.62 <sup>a</sup>	3.11 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	5.67 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	4.12 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	8.55 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>
<i>Pinus halepensis</i>	251.40 $\pm$ 7.07 <sup>b</sup>	3.69 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	18.87 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.15 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	1.98 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>

The values are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3). <sup>a</sup>Significantly higher than the <sup>b</sup>value of the same column ( $p < 0.05$ ). Total phenols are expressed micrograms of gallic acid equivalent per gram of dry extract ( $\mu\text{g GAE}/\text{g DE}$ ). Total flavonoids are expressed as micrograms of quercetin equivalents per gram of dry extract ( $\mu\text{g QE}/\text{g DE}$ ). DPPH scavenging activity is expressed as the concentration inhibiting 50% radical ( $\text{IC}_{50}$ ). ABTS scavenging activity is expressed as millimole of Trolox equivalent per milligram of dry extract ( $\text{mM TE}/\text{mg DE}$ ). Ferric reducing-antioxidant power is expressed as millimole  $\text{FeSO}_4$  equivalent per mg dry extract ( $\text{mM FeSO}_4/\text{mg DE}$ ).



These results were in concordance with those obtained with DPPH and ABTS radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power. This concordance could be partially explained by the presence of flavonoids in both extracts and the higher polyphenolic content found in *Quercus ilex* extract that was twofold the polyphenolic content of *Pinus halepensis* extract. The protective effect of flavonoids and polyphenols on erythrocyte membrane was previously reported (Chaudhuri et al., 2007; De Freitas et al., 2008). Sohretoglu et al. (2007) reported in their study conducted on the protective effect of three different *Quercus* species, *Quercus cerris*, *Quercus macranthera* and *Quercus aucherii* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced cytotoxicity, a significant protective effect of the plants extracts at 10 and 25 µg/mL concentrations against hydrogen peroxide induced hemoglobin release from erythrocytes.

Catechin, the major phenolic compound in both studied extracts, was shown by Grzesik et al. (2018) to be a potent antihemolytic compound. It prolonged the time of hemolysis by more than

100% at a concentration of 25 µM in AAPH induced hemolysis and at concentration of 1 µM in hypochlorite induced hemolysis.

#### Effect of *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* extracts on DNA damage

UV-photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to the formation of highly reactive and strong oxidizing hydroxyl radical. The OH radicals can damage all components of DNA molecules such as purine bases, pyrimidine bases and the deoxyribose backbone (Cadet et al., 2015). Hence, the native supercoiled configuration of plasmid DNA changes to open circular and nicked linear forms, which cause a change in their electrophoretic mobility properties on the gel (Yasmeen and Gupta, 2016).

Fig. 4A shows the electrophoretic pattern of DNA in the presence or absence of different concentrations (100, 250, 350 and 500 µg/mL) of *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* extracts. The plasmid DNA showed two bands on agarose gel electrophoresis (lane 1), the faster moving prominent band corresponded to the native supercoiled circular DNA (sc DNA) and the slower moving very

faint band was the open circular form (oc DNA). The UV irradiation of DNA in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lane 2) induced the cleavage of sc DNA to give prominent oc DNA and a faint linear (Lin) DNA, indicating that OH generated from UV-photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced DNA strand scission. It was noted that only UV treatment and only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (lanes 3 and 4, respectively) could not induce damage as noted in combined treatment (lane 2). The addition of the extracts (lanes 6-9) to the reaction mixture suppressed the for-

mation of lin DNA and induced a significant protection of native supercoiled circular DNA in a dose-dependent manner. In fact, in the presence of 100, 250, 350 and 500 µg/mL of *Quercus ilex* extract, the intensity of sc DNA bands (Fig. 4B) scanned from the agarose gel electrophoretic patterns was 61.82, 69.04, 83.55 and 86.33%, respectively. The presence of 100, 250, 350 and 500 µg/mL of *Pinus halepensis* extract gave an intensity values of 89.64, 91.26, 92.53 and 94.41%, respectively as compared with the untreated plasmid DNA.

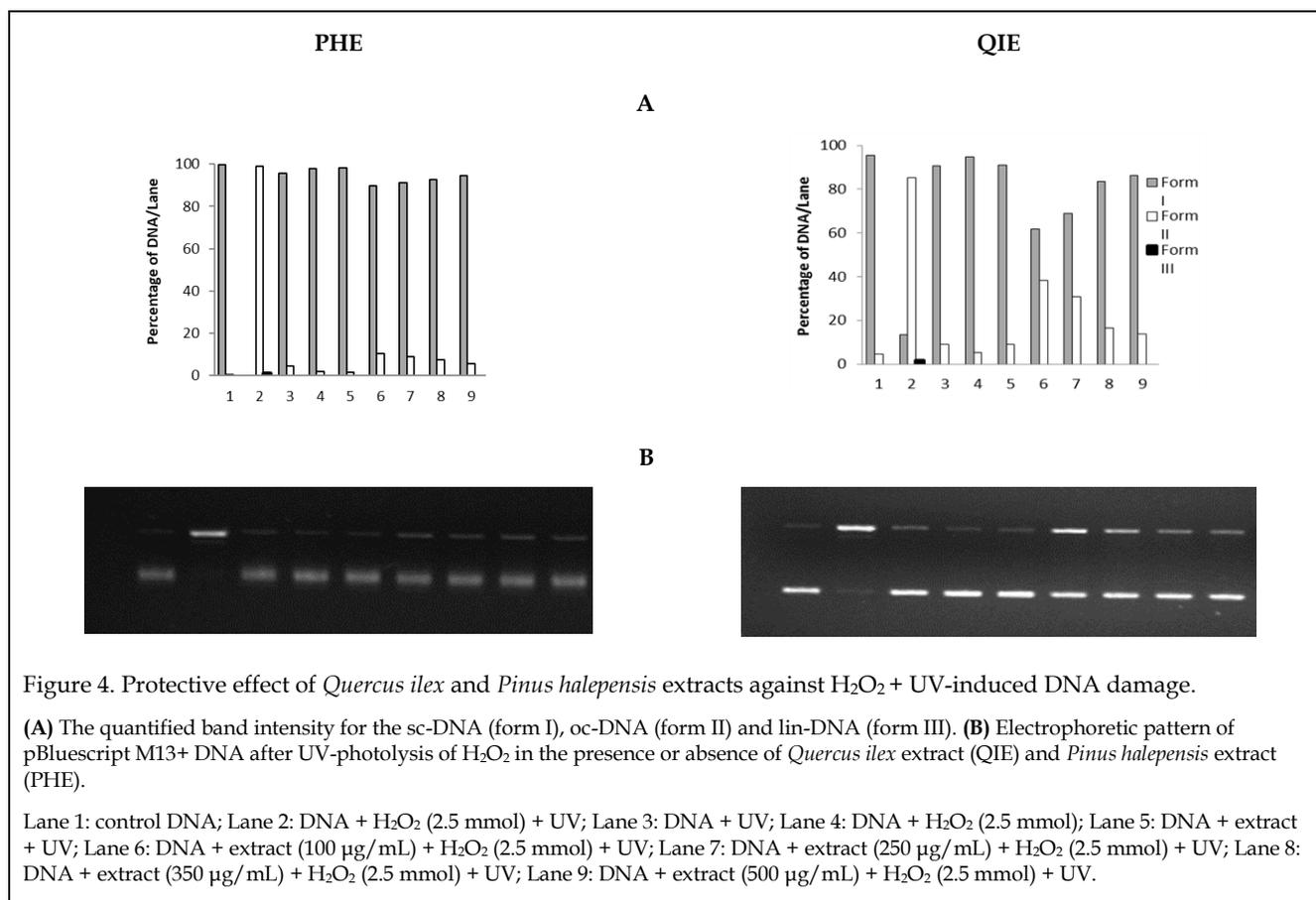


Figure 4. Protective effect of *Quercus ilex* and *Pinus halepensis* extracts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + UV-induced DNA damage.

(A) The quantified band intensity for the sc-DNA (form I), oc-DNA (form II) and lin-DNA (form III). (B) Electrophoretic pattern of pBluescript M13+ DNA after UV-photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of *Quercus ilex* extract (QIE) and *Pinus halepensis* extract (PHE).

Lane 1: control DNA; Lane 2: DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mmol) + UV; Lane 3: DNA + UV; Lane 4: DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mmol); Lane 5: DNA + extract + UV; Lane 6: DNA + extract (100 µg/mL) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mmol) + UV; Lane 7: DNA + extract (250 µg/mL) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mmol) + UV; Lane 8: DNA + extract (350 µg/mL) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mmol) + UV; Lane 9: DNA + extract (500 µg/mL) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mmol) + UV.

This protective activity against DNA damage could be assigned to the presence of potent antioxidants in the extracts. Phenolic compound seems to be the best candidates for this effect. Indeed, Sevgi et al. (2015) reported that phenolic acids possess protective effects on pBR322 plasmid DNA against the mutagenic and toxic effects of UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The studies of Piao et al. (2013) and George et al. (2017) affirmed that flavonoids protect DNA

against oxidative damage induced by carcinogenic agent such as γ irradiation and benzo(a)pyrene in human leukemia cells (HL-60) and Chinese hamster lung fibroblasts (V79-4).

## CONCLUSIONS

The results obtained from this study showed that *Quercus ilex* root bark and *Pinus halepensis*

young ovulate cone methanolic extracts exhibit significant antioxidant, antihemolytic and DNA protective effects. These effects may be due to their high content of phenolic and flavonoid contents. These results provide evidence that these plants could be potential sources of natural antioxidant agents and good candidates for future biomedical applications to promote human health with limited side effects.

---

## CONFLICT OF INTEREST

---

The authors declare no conflict of interest.

---

## ACKNOWLEDGMENTS

---

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. Project Ref: CNEPRU/D01N01UN190120150001.

---

## REFERENCES

---

- Abay G, Altun M, Kolda S, Tüfekçi A R, Demirtas I (2015) Determination of antiproliferative activities of volatile contents and HPLC profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Comb Chem High Throughput Screening* 18: 1-11.
- Aboul-Enein HY, Kruk I, Kładna A, Lichszteid K, Michalska T (2007) Scavenging effects of phenolic compounds on reactive oxygen species. *Biopolymers* 3: 222-230.
- Aman S, Moin S, Owais M, Siddiqui MU (2013) Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *Int J Pharm Sci Invention* 2: 55-60.
- Amessis-Ouchemoukh N, Ouchemoukh S, Meziante N, Idiria Y, Hernanzc D, Stincod CM, Rodriguez-Pulido FJ, Heredia FJ, Madania K, Luis J (2017) Bioactive metabolites involved in the antioxidant, anticancer and anticalpain activities of *Ficus carica* L., *Ceratonia siliqua* L. and *Quercus ilex* L. extracts. *Ind Crops Prod* 95: 6-17.
- Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127: 183-198.
- Belkacem N, Djaziri R, Lahfa F, El-Haci I A, Boucherit Z (2014) Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activity of various *Punica granatum* L. peel extracts from Algeria: A comparative study. *Phytothérapie* 12: 372-379.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.
- Berahou A, Auhmanib A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Gadhi CA (2007) Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *J Ethnopharmacol* 112: 426-429.
- Bhatt ID, Rawat S, Rawal RS (2013) Antioxidants in medicinal plants. In: S Chandra, H Lata, A Verma (Eds.): *Biotechnology for Medicinal Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 296-326.
- Bland JS (1995) Oxidants and antioxidants in clinical medicine: Past, present and future potential. *J Nutr Environ Med* 5: 255-280.
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL (2015) Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA Radiation. *Photochem Photobiol* 91: 140-155.
- Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta PK (2007) Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *Int J Biol Macromol* 41: 42-48.
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352.
- De Freitas MV, Netto RM, Da Costa Huss JC, De Souza TMT, de Oliveira CJ, Firmino CB, Penha-Silva N (2008) Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol in Vitro* 22: 219-224.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM, Stocker P (2010) Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem Toxicol* 48: 2599-2606.
- García Villalba R, Espín JC, Tomás-Barberán FA, Rocha-Guzmán NE (2017) Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of the phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas. *J Food Compos Anal* 63: 38-46.
- García-Becerra L, Mitjans M, Rivas-Morales C, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Vinardell MP (2016) Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chem* 194: 1081-1088.
- George VC, Dellaire G, Rupasinghe HPV (2017) Plant flavonoids in cancer chemoprevention: Role in genome stability. *J Nutr Biochem* 45: 1-14.
- Girard A, Madani S, Boukortt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J (2006) Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* 22: 758-766.
- Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I (2018) Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem* 241: 480-492.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53: 1841-1856.
- Khenouf S, Benabdallah H, Gharzouli K, Amira S, Ito H, Kim TH, Yoshida T, Gharzouli A (2003) Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *J Agric Food Chem* 51: 1469-1473.
- Kizil M, Kizil G, Yavu ZM, Çeken B (2010) Protective activity of ethanol extract of three achillea species against lipid

- peroxidation, protein oxidation and DNA damage *in vitro*. *Acta Aliment* 39: 457–470.
- Kizilarlan C, Sevgi E (2013) Ethnobotanical uses of genus *Pinus* L. (Pinaceae) in Turkey. *Indian J Tradit Know* 12: 209–220.
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 711: 193–201.
- Kutlu T, Takim K, Çeken B, Kizil M (2014) DNA damage protecting activity and *in vitro* antioxidant potential of the methanol extract of Cherry (*Prunus avium* L.). *J Med Plants Res* 8: 715–726.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 102: 771–776.
- Males Z, Pilepic K H, Petrovic L, Bagaric I (2010) Quantitative analysis of phenolic compounds of *Inula candida* (L.) Cass. *Period Biol* 112: 687–692.
- Meziti A, Bouriche H, Meziti H, Kadaa S, Abderrahmane S (2017) Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Rubus fruticosus* and *Zizyphus vulgaris* methanol extracts. *Int J Pharm Pharm Sci* 9: 69–76.
- Moghaddam AH, Nabavi SM, Nabavi SF, Bigdellou R, Mohammadzadeh S, Ebrahimzadeh MA (2012) Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of *Diospyros lotus* seeds. *Acta Pol Pharm* 69: 687–692.
- Parikh B, Patel VH (2017) Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit: Rayan [*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard]. *Food Sci Human Wellness* 6: 10–19.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015) Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 30: 11–26.
- Piao MJ, Kim KC, Chae S, Keum YS, Kim HS, Hyun JW (2013) Protective effect of fisetin (3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) against  $\gamma$ -irradiation-induced oxidative stress and cell damage. *Biomol Ther* 21: 210–215.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO (2002) Physiological action of antioxidant defences. *Nutr Clin Metabol* 16: 233–239.
- Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Rapisarda P, Dederen JC (1998) *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* photoprotective effect of red orange extract. *Int J Cosmet Sci* 20: 331–342.
- Sánchez A, Calpena AC, Clares B (2015) Evaluating the oxidative stress in inflammation: Role of melatonin. *Int J Mol Sci* 16: 16981–17004.
- Santos SAO, Pinto PCRO, Silvestre AJD, Neto CP (2010) Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Ind Crops Prod* 31: 521–526.
- Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C (2015) Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol* 77: 12–21.
- Sohretoglu D, Ekizoglu M, Kılıç E, Sakar K (2007) Antibacterial and antifungal activities of some *Quercus* species growing in Turkey. *FABAD J Pharm Sci* 32: 127–130.
- Süntar I, Tumen I, Ustün O, Keleş H, Akkol EK (2012) Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by *in vivo* and *in vitro* experimental models. *J Ethnopharmacol* 139: 533–540.
- Tolić MT, Krbavčić IP, Vujević P, Milinović B, Jurčević IL, Vahčić N (2017) Identification of phenolic compound by HPLC-TOF MS. *Pol J Food Nutr Sci* 67: 67–74.
- Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230–235.
- Vinha AF, Costa ASG, Barreira JCM, Pacheco BR, Oliveira PP (2016) Chemical and antioxidant profiles of acorn tissues from *Quercus* spp.: Potential as new industrial raw materials. *Ind Crop Prod* 94: 143–151.
- Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, La Voie E J, Huang T, Ho C (1998) Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 46: 4869–4873.
- Yasmeen S, Gupta P (2016) *In vitro* demonstration of *Dalbergia sissoo* (Indian rosewood) methanolic extracts as potential agents for sun screening and DNA nick prevention. *Int J Pharm Pharm Sci* 8: 175–181.
- Zhang H, Tsao R (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 8: 33–42.

**AUTHOR CONTRIBUTION:**

Contribution	Meziti H	Bouriche H	Kada S	Demirtas I	Kizil M	Senator A
Concepts or ideas						x
Design						x
Definition of intellectual content						x
Literature search	x					
Experimental studies	x		x	x	x	
Data acquisition	x		x	x	x	
Data analysis	x	x				
Statistical analysis	x					
Manuscript preparation	x					
Manuscript editing	x					
Manuscript review	x	x	x	x	x	x

**Citation Format:** Meziti H, Bouriche H, Kada S, Demirtas I, Kizil M, Senator A (2019) Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts. J Pharm Pharmacogn Res 7(4): 260-272.

## Résumé

La présente étude vise à déterminer la composition phytochimique ainsi qu'à évaluer les effets biologiques de l'extrait méthanolique de l'écorce de racine de *Quercus ilex* (EQI) et de l'extrait des jeunes cônes femelle de *Pinus halepensis* (EPH). L'étude phytochimique des extraits a montré qu'ils ont une teneur considérable en composés phénoliques et de flavonoïdes. L'analyse HPLC a permis d'identifier la catéchine et cinq acides phénoliques (acide 4-hydroxybenzoïque, acide caféique, acide coumarique, acide ferulique et acide gentisique) dans le EQI. La catéchine et l'acide cinnamique ont été identifiés dans le EPH. Les activités antioxydantes in vitro des extraits de *Quercus* et de *Pinus* ont été évaluées en déterminant les activités de balayage des radicaux DPPH et ABTS et le pouvoir de réduction ferrique/antioxydant (FRAP). Les valeurs de la CI50 pour l'essai de DPPH étaient de 5,69 µg/ml et de 18,88 µg/ml, respectivement. La capacité antioxydante contre le radical ABTS était de 4,13 et de 1,15 mM équivalent trolox /mg d'extrait de. Les extraits étudiés ont également montré une capacité considérable de réduction de fer avec 1,98 et 8,55 mM FeSO<sub>4</sub>/mg d'extrait, respectivement. De plus, il a été démontré que les deux extraits exercent un effet protecteur important contre l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH, avec une augmentation dose dépendante du temps de demi hémolyse (HT50). la valeur HT50 enregistré a atteint 93,63 min et 143,6 min pour EPH et EQI à une concentration de 75µg/ml respectivement, contre 30,22 min pour le témoin non traité. Les extraits étudiés ont également présenté de bonnes activités de protection de l'ADN vis-à-vis de l'oxydation induite par photolyse sous UV du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au rayonnement UV en présence de peroxyde d'hydrogène. Le traitement par voie orale des souris par l'extraits de *Pinus halepensis* et *Quercus ilex* a donné un effet anti-inflammatoire avec des taux d'inhibition de 40,15% et 28,78% respectivement. De sa part, l'application topique des deux extraits a réduit de 69,66% et 41,74% respectivement, l'inflammation de l'oreille induite par l'huile de croton. L'activité anti-inflammatoire a été confirmée par les tests d'évaluation des effets des extraits étudiés sur les fonctions du neutrophile humain. Les deux extraits ont montré une inhibition significative et dose dépendante de l'activité de l'élastase et de la mielopéroxydase des neutrophiles. La flambé respiratoire est également inhibé par les EPH et EQI (IC50 : 21,55 µg/ml et 6,46 µg/ml). Cependant, dans le test de phagocytose de *Candida albicans* par les neutrophiles humains, les extraits étudiés ont montré une inhibition légère et non significative du pourcentage de phagocytose, de l'indice de phagocytose et de la bactéricidie.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *Quercus ilex* et de *Pinus halepensis* représentent une importantes sources de composés bioactifs possédant des effets antioxydants, antihémolytiques et génoprotectifs et anti-inflammatoires considérables

**Mots clés :** *Pinus halepensis*, *Quercus ilex*, antioxydant, antihémolytique, genoprotection, anti-inflammatoire.

## ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو تحديد التركيب الكيميائي النباتي وتقييم الآثار البيولوجية لمستخلص الميثانول للحاء جذور نبات *Quercus ilex* (QIE) ومستخلص المخاريط الأنثوية لنبات *Pinus halepensis* (PHE). أوضحت الدراسة الكيميائية النباتية للمستخلصات أنها تحتوي على نسبة كبيرة من المركبات الفينولية والفلافونويدات. حدد تحليل HPLC وجود الكاتشين وخمسة أحماض فينولية (حمض هيدروكسي بنزويك وحمض الكافيين وحمض الكوماريك وحمض الفيرليك وحمض الجنتيسيك) في QIE. وقد تم التعرف كاتشين وحمض سيناميك في PHE. تم تقييم أنشطة مضادات الأكسدة في المختبر لمستخلصات *Pinus halepensis* و *Quercus ilex* من خلال تحديد أنشطة الكسح لجذور DPPH و ABTS والفعالية المضادات الأكسدة بارجاع الحديدك (FRAP). وكانت قيم IC50 لفحص DPPH مساوية لـ 5.69 ميكروغرام / مل و 18.88 ميكروغرام / مل ، على التوالي. كانت القدرة المضادة للأكسدة ضد جذر ABTS و 4.13 و 1.15 ملي مول مكافئ طرولوكس / ملغم مستخلص. كما أظهرت المستخلصات التي تمت دراستها قدرة كبيرة على إرجاع الحديد باستخدام 1.98 و 8.55 ملي مول FeSO<sub>4</sub> / ملغم مستخلص على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، فقد ثبت أن كلا المستخلصين لهما تأثير وقائي كبير ضد انحلال عن كريات الدم الحمراء الناتج عن AAPH ، مع زيادة تعتمد على الجرعة في زمن نصف انحلال الدم (HT50). بلغت قيمة HT50 المسجلة 93.63 دقيقة و 143.6 دقيقة لـ EPH و EQI بتركيز 75 ميكروغرام / مل ، مقارنة بـ 30.22 دقيقة للعينات غير المعالجة. أظهرت المستخلصات التي تمت دراستها أيضًا أنشطة جيدة لحماية الحمض النووي في مقابل الأكسدة الناتج عن التحلل الضوئي للأشعة فوق البنفسجية لبيروكسيد الهيدروجين. أعطى العلاج عن طريق الفم للفئران بالمستخلصات EPH و EQI تأثير مضاد للالتهاب الأذن المحفز بالكزبان مع معدلات تثبيط من 40.15 % و 28.78 % ، على التوالي. من جانبه ، أدى التطبيق الموضعي لكلا المستخلصين في نموذج التهاب الأذن الناتج عن زيت الكروتون إلى تقليل الالتهاب بنسبة 69.66% و 41.74% على التوالي. تم تأكيد النشاط المضاد للالتهابات من خلال اختبارات تقييم آثار المستخلصات التي تمت دراستها على وظائف الخلايا البيضاء المتعادلة البشرية. أظهر كلا المستخلصين تثبيطًا كبيرًا ويعتمد على الجرعة في نشاط إنزيم الإيلاستاز و إنزيم الميالو بيروكسيداز. تبين أن المستخلصين قادرين على تثبيط الانفجار التنفسي (IC50 : 21.55 ميكروغرام / مل و 6.46 ميكروغرام / مل بالترتيب). ومع ذلك ، في اختبار البلعمة الخلوية لخلايا خميرة *Candida Albicans* من قبل الخلايا المتعادلة البشرية ، أظهرت المستخلصات التي تمت دراستها تثبيط طفيف وغير مهم لنسبة البلعمة ، مؤشر البلعمة ونشاطية قتل الجراثيم.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلصات *Pinus halepensis* و *Quercus ilex* تمثل مصدرًا هامًا للمركبات النشطة بيولوجيًا مع تأثيرات معتبرة مضادة للأكسدة، مضادة لتحلل كريات الدم الحمراء، واقية للحمض النووي ومضادة للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: *Pinus halepensis*، *Quercus ilex*، مضادات الأكسدة، مضادات التحلل، الوقاية الوراثة، مضادة للالتهابات.