

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département Biologie Physico-chimique  
Option : Pharmacologie moléculaire



Réf : .....

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

**Master**

***Thème***

**Contribution à l'étude des activités biologiques de la  
résine de *Pinus halepensis* Mill**

**Présenté par :**

AMARI Meryem & MECHOUICHE Katia

Soutenu le : **21 Juin 2017**

**Devant le jury composé de:**

M <sup>r</sup> BELKACEM.N	MAA	Président
M <sup>me</sup> KHEYAR-KRAOUCHE. N	MAA	Promotrice
M <sup>elle</sup> ADRAR.S	MAA	Examinatrice

**Année universitaire : 2016 / 2017**



## *Remerciements*

*Avant toute chose nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force et la patience afin de pouvoir réaliser ce travail.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude à notre promotrice Mme KRAOUCHE née KHEYAR, N de nous avoir facilitée la réalisation de ce mémoire, en mettant à notre disposition tout ce dont nous avons besoin et pour les conseils avisés, sa disponibilité au quotidien, ses orientations, ses encouragements et son aide précieuse tout au long du travail*

*Nous remercions Mr BELKACEM, N pour l'honneur qu'il nous a fait de présider ce jury, et Melle ADRAR, S pour avoir acceptée d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements les plus cordiaux à Mr BRIBI pour son aide et ses conseils et Mme ATHMANIOU, technicienne du laboratoire de Chimie qui nous avoir permis de travailler dans le laboratoire sur laquelle elle est responsable.*

*Comme nous sommes très reconnaissantes à toutes l'équipe de laboratoire de Biochimie Appliquée pour leur conseils et leur aide dans la réalisation de la partie in vivo, en particulier Mme ATHMANI, Mme RAHMANI et Melle BELOUKEL.*

*Enfin nos remerciements s'adressent plus particulièrement à nos familles et toutes personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*



# Dédicaces

## JE DEDIE CE TRAVAIL

### ❖ *A Mon père AKLI et à ma mère YAMINA*

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

*A mon cher père, pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Votre souci a toujours été de satisfaire vos enfants et de ne pas rester indifférent à leurs multiples préoccupations. Vos conseils, votre courage et votre rigueur ont été pour moi d'un soutien inestimable tout au long de mes études. Trouvez ici l'expression de toute ma considération pour vos multiples actes de générosités.*

*Je prie DIEU le tout puissant vous accordez longue vie afin de goûter aux fruits de ce travail qui est le vôtre.*

*Je t'aime papa, Je t'aime maman.*

### ❖ *A mes frères et sœurs : Yousef, Rabia, Yassine, Fouzia, Mobarika, Aicha, Rabiha et Soria*

*Merci de m'avoir soutenu et témoigné votre affection durant tout ce temps. J'ai toujours pu compter sur vous quel que soit le moment. Restons unis et soyons à la hauteur de nos parents.*

*Que DIEU vous bénisse.*

### ❖ *A tous les ami(e)s qui m'ont soutenu de près ou de loin*

### ❖ *A tous ceux que j'aime*

MERYEM

## *Dédicace*



*Grace a Allah tout puissant, qui m'a donné la volonté et m'a illuminé le chemin pour mener à bien mon étude et la finir par ce travail qui je dédie :*



*A mes chers parents qui m'ont encouragé et soutenue pendant mes études.  
Que dieu les garde afin que leurs regard puisse suivre ma destinée.*



*A mon fiancé Hamza qui ma encouragé pendant ce travail et à sa famille.*



*A ma cher unique sœur Kahina.*



*A mes chers frères Fouad, Imad et Ishak,*



*A ma binôme et amie Meryem et sa famille.*



*A mes copines Yamina, Fahima et Nawel.*



*A tout mes amis(es) pour leur soutien, leur aide et leur présence.*



*A tous ceux que j'aime.*

*Katia*

# Sommaire

## Sommaire

*Liste des abréviations*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

***Introduction*** ..... 1

### *Partie bibliographique*

I.1. Activités biologiques des polyphénols.....	2
I.1.1. Activité antioxydante .....	2
I.1.1.1. Stress oxydatif .....	2
I.1.1.2. Propriétés antioxydantes des polyphénols.....	4
I.1.2. Activité anti inflammatoire .....	4
I.1.2.1. Inflammation .....	4
I.1.2.2. Types d'inflammation .....	4
I.1.2.3. Anti-inflammatoires .....	4
I.1.3. Activité analgésique .....	5
I.1.3.1. Douleur .....	5
I.1.3.2. Analgésiques .....	5
I.1.3.3. Activité analgésique des polyphénols .....	6
I.2. Etude de la toxicité.....	7
I.2.1 Définition.....	7
I.2.2. Essais de la toxicité .....	7
I.2.3. Toxicité aigüe .....	7
I.2.4. Toxicité subaiguë .....	8
I.3. Plante <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	9
I.3.1. Description botanique.....	9
I.3.2. Résine de <i>Pinus halepensis</i> .....	10
I.3.2.1. Données pharmacologique .....	11
I.3.2.2. Composition chimique .....	11

*Partie expérimentale*  
*II-Matériel et méthodes*

II.1. Matériel .....	12
II.1.1. Matériel végétal .....	12
II.1.2. Animaux et conditions d'élevage.....	12
II.2. Méthodes.....	12
II.2.1. Préparation d'extrait phénolique.....	12
II.2.2. Extraction des composées phénoliques.....	13
II.2.3. Criblage phytochimique.....	14
II.2.3.1. Dosage des phénols totaux.....	14
II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	14
II.2.3.3. Dosage des tannins condensés .....	14
II.2.4. <i>Tests in vitro</i> : Etude de l'activité antioxydante .....	15
II.2.4.1. Pouvoir réducteur.....	15
II.2.4.2. Activité scavenging de radical DPPH.....	16
II.2.5. <i>Tests in vivo</i> : Etude toxicologique et pharmacologique .....	16
II.2.5.1. Etude de la toxicité aiguë.....	16
II.2.5.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire .....	17
a. Œdème de l'oreille induit par le xylène .....	17
b. Œdème plantaire induit par la carragénine.....	18
II.2.5.3. Evaluation de l'activité anti-nociceptive .....	19
a. Test de contorsions.....	19
b. Test d'immersion de la queue .....	20
II.3. Etude statistique.....	21

### *III-Résultats et discussion*

III.1. Taux d'extraction et analyse phytochimique.....	23
III.1.1. Taux d'extraction.....	23
III.1.2. Dosage des composés phénoliques de la résine de <i>P. halepensis</i> .....	24
III.2. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	26
III.2.1. Pouvoir réducteur .....	26
III.2.2. Effet scavenger contre le radical DPPH .....	27
III.3. Etude de l'activité pharmacologique de la résine de <i>P.halepensis</i> .....	29
III.3.1. Evaluation de la toxicité aiguë .....	29
III.3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire .....	31
III.3.2.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène .....	31
III.3.2.2. Œdème plantaire induit par la carragénine .....	33
III.3.3. Evaluation de l'activité analgésique .....	37
III.3.3.1. Activité analgésique périphérique « Test de contorsions » .....	37
III.3.3.2. Activité analgésique centrale « Test de l'immersion de la queue » .....	38
<b><i>Conclusion et perspectives</i></b> .....	40

#### ***Références bibliographiques***

#### ***Annexes***

## *Liste des abréviations*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdiens

**AIS** : Anti-inflammatoire stéroïdiens

**ASA** : Acide acétylsalicylique

**BHA** : Butylhydroxyanisole

**COX** : Cyclooxygénase

**DL50** : Dose létale 50

**DPPH** : 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle

**EAG** : Equivalent d'acide gallique

**EC** : Equivalent catéchine

**EOR<sub>s</sub>** : Espèces réactives de l'oxygène

**EQ** : Equivalent de quercétine

**LOX** : Lipoxygénase

**NO** : Oxyde nitrique

**OH** : Groupements hydroxyles

**PID** : Pourcentage d'inhibition de la douleur

**PLA2**: phospholipase A2

**SEM**: Standard error of mean

## *Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Effet biologique des polyphénols	2
2	Causes et conséquences de stress oxydant	3
3	Photographie originale de l'arbre de <i>Pinus halepensis</i> (a), des cônes (b), de l'écorce (c)	10
4	structure chimique d' $\alpha$ -pinène	11
5	Photographie de la résine de <i>Pinus halepensis</i> Mill	12
6	Photographie de la résine sèche de <i>P.halepensis</i> Mill	13
7	Œdème de l'oreille droite induit par le xylène	18
8	Œdème plantaire induit par la carragénine : A) Injection de la carragénine au niveau de la patte arrière gauche de la souris, B) Mesure du volume de la patte de souris par le Pléthysmomètre	19
9	Etirement des pattes postérieures et contractions des muscles abdominales	20
10	Immersion de la queue dans l'eau chaude	21
11	Evaluation du pouvoir réducteur d'extrait phénolique de la résine de <i>P.halepensis</i> et des standards à 100 $\mu\text{g/ml}$	26
12	Evaluation de pouvoir anti-radicalaire au DPPH d'extrait phénolique de la résine de <i>P.halepensis</i> et des standards à 100 $\mu\text{g/ml}$	27
13	Courbe d'évolution de la variation du volume de l'œdème inflammatoire ( $\Delta v$ ) en fonction du temps	33
14	Inhibition de l'inflammation de l'œdème induite par la carragénine par l'extrait phénolique de la résine de <i>P.halepensis</i>	35
15	Effet analgésique de l'extrait phénolique de la résine de <i>P. halepensis</i> à 200 mg/kg et l'acide acétylsalicylique suite au test de l'immersion de queue	39

## *Liste des tableaux*

<b>Tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
I	Les formes d'intoxication	7
II	Classification de la toxicité aigüe	7
III	Taux d'extraction et dosage des composés phénoliques	24
IV	Résultats des observations du test de la toxicité aigüe de l'extrait phénolique de la résine de <i>Pinus halepensis</i> chez les souris	30
V	Effet de l'extrait phénolique de la résine de <i>P. halepensis</i> et le diclofenac sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène	31
VI	Effet analgésique de l'extrait phénolique de la résine de <i>P. halepensis</i> à 200 mg/kg et l'acide acétylsalicylique suite au test de torsion induit par l'acide acétique	37

# *Introduction*

## Introduction

Les plantes médicinales sont une source intéressante de nouvelles molécules candidates pour la lutte contre différentes pathologies, grâce à leurs métabolites secondaires. Mais, avant de pouvoir recommander l'usage de telle ou telle espèce contre une maladie, il est nécessaire de valider l'usage traditionnel qui en est fait. En d'autres termes, il convient d'évaluer scientifiquement l'activité pharmacologique de la plante médicinale retenue. De plus, il est impératif de vérifier également l'absence de toxicité des plantes employées. L'usage de plantes médicinales locales, en réponse à des problèmes de santé peut-être perçu comme une alternative aux médicaments qui, bien qu'étant efficace présentent le plus souvent une variété d'effets indésirables lourds de conséquences (troubles digestifs, rénaux, vasculaires, cytotoxicité ...etc.), et parfois même causes de mortalités.

La famille des résineuses, spécialement le groupe "*halepensis*" représente un capital forestier majeur sur le pourtour de la méditerranée. La résine de cette plante a été choisie sur la base de son utilisation en médecine traditionnelle locale comme antiseptique des voies respiratoires et urinaires, antifongique, anti-inflammatoire, analgésique, antimicrobien et anti tumoraux (**Motte-Florac, 2000**).

Ainsi, la présente étude est portée sur l'étude phytochimique et pharmacologique de la résine de *Pinus halepensis* pour avoir quelques informations concernant ses constituants et son activité biologique.

Dans un premier temps, un criblage phytochimique a été initié par détermination des teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tannins, suivi des tests préliminaires concernant son activité antioxydante *in vitro* par l'évaluation de l'effet scavenging du radical DPPH et du pouvoir réducteur.

Deuxièmement, l'expérimentation animale a été entamée dans cette étude, d'abord par un test de toxicité aigüe afin de sélectionner les doses thérapeutiques et par l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par deux modèles d'œdèmes ; par la carragénine au niveau de la patte et celui de xylène au niveau de l'oreille. Aussi, l'évaluation de l'effet analgésique de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis* a été complétée par deux tests à savoir le test de l'acide acétique et le test d'immersion de la queue.

## *Partie bibliographique*

## I.1. Activités biologiques des polyphénols

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmacologiques. La figure 01 présente les effets biologiques de polyphénols à savoir : l'effet anti-oxydant, anti-inflammatoire et analgésique.

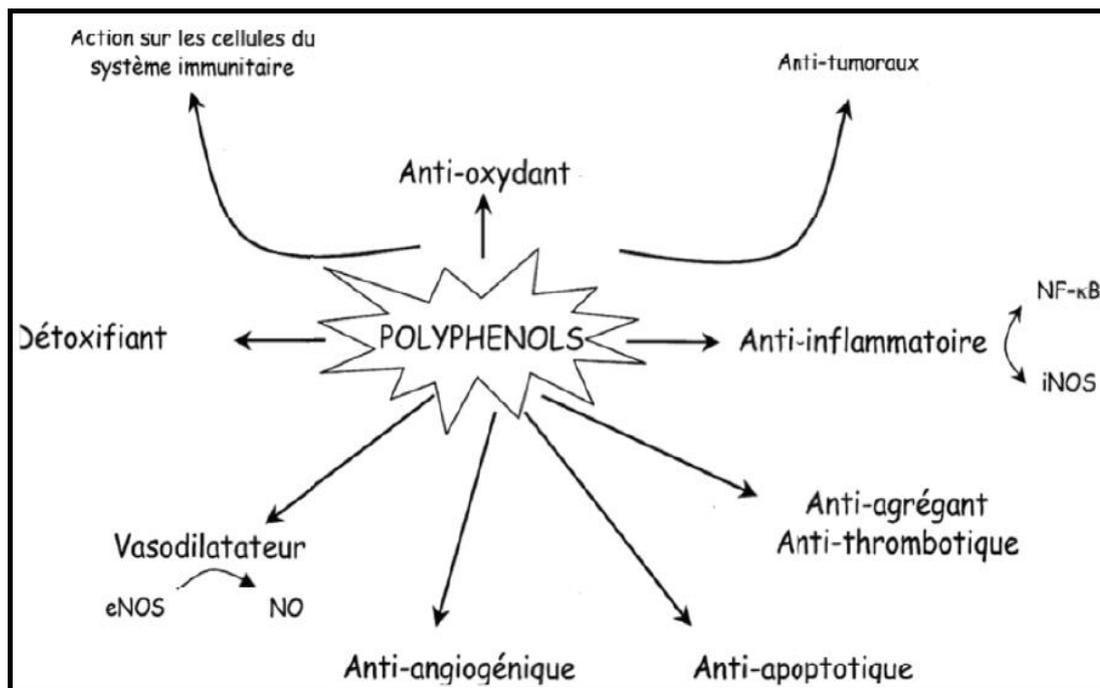


Figure 01 : Effet biologique des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

### I.1.1. Activité antioxydante

#### I.1.1.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la génération des espèces réactifs de l'oxygène (EROs) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Reuter et al., 2010).

- **Origine de rupture d'équilibre**

Cette rupture d'équilibre dans la balance métabolique cellulaire, peut être causée par plusieurs facteurs tels que la production endogène massive de radicaux libres par activation de macrophages, de polynucléaires, des cellules endothéliales ou de la mitochondrie. Une exposition à des facteurs pro-oxydants (pesticides, radiations, métaux lourds, tabac, alcool).

Un déficit nutritionnel en fruits et légumes où se trouve la majorité des antioxydants comme les vitamines (vitamines C et E) ou les oligoéléments, les caroténoïdes et les polyphénols (Favier, 2006).

- **Conséquences du stress oxydant**

La surproduction exagérée des radicaux libres peut être à l'origine des lésions directes des molécules biologiques en réagissant avec l'ADN, lipides, protéines et glucides (figure 02).

- ✓ Au niveau de l'ADN : les EROs peuvent induire des effets oxydatifs et mutagènes ou un arrêt des réplifications. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins (Koechlin-Ramonatxo, 2006).
- ✓ Les lipides sont une cible privilégiée des radicaux libres. Ceux-ci provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés des lipides, et touchent les phospholipides membranaires, provoquant l'athérosclérose (Favier, 2003).
- ✓ Les EROs peuvent provoquer la perturbation des fonctions enzymatiques par oxydation et altération des protéines (Dean et al., 1997).

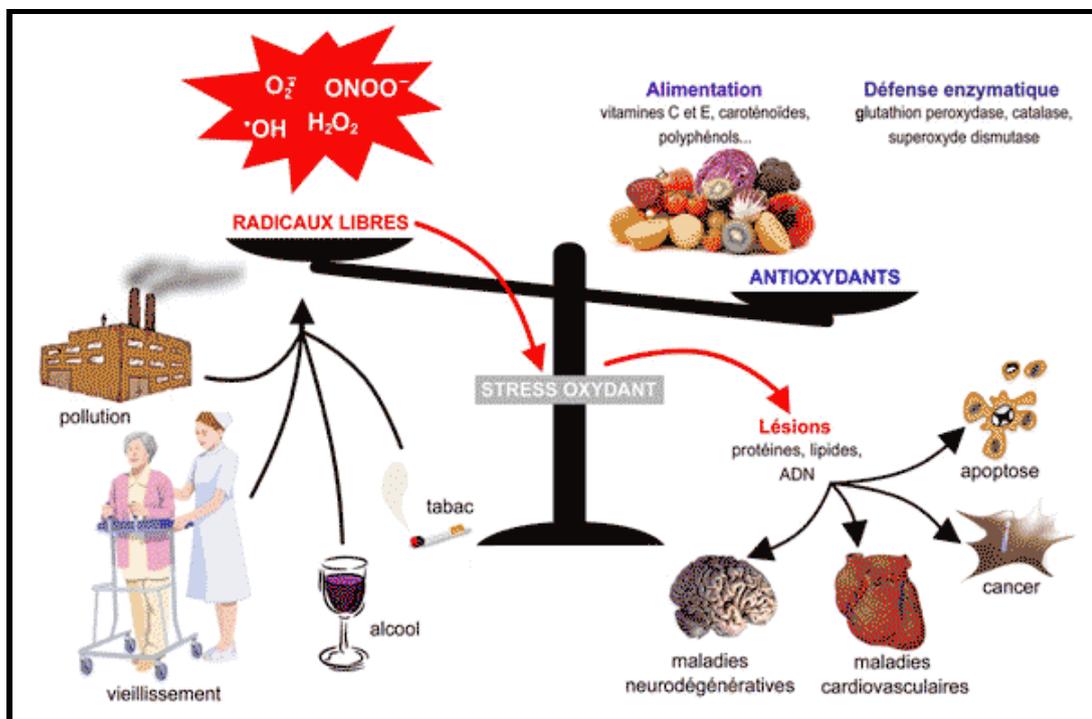


Figure 02 : Causes et conséquences de stress oxydant (Morandat et El Kirat, 2013).

### **I.1.1.2. Propriétés antioxydantes des polyphénols**

La reconnaissance des composés phénoliques comme antioxydants naturels est maintenant bien acquise et elle est pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces molécules dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. Grâce à leur diversité structurale, les composés phénoliques sont impliqués dans cette activité via plusieurs mécanismes en agissant à différents niveaux des réactions radicalaires par la chélation des métaux, l'effet scavenger, l'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres et l'induction de la synthèse des enzymes antioxydantes (**Cotelle et al., 1995; Gramza et Korczak, 2005**).

## **I.2. Activité anti inflammatoire**

### **I.2.1. Inflammation**

L'inflammation est une réaction de défense naturelle des organismes vivant contre toute agression extérieure ou une stimulation cellulaire excessive ou anormale qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse. Elle a pour rôle essentiel l'élimination de l'agent pathogène et la réparation du tissu lésé (**Delarue, 2001**).

### **I.2.2. Types d'inflammation**

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoires :

- **Inflammation aiguë**

L'inflammation aiguë est une étape initiale de l'inflammation, qui est médiée par l'activation du système immunitaire. Elle est caractérisée par quatre phénomènes particuliers qui sont la rougeur, la chaleur, l'œdème et la douleur (**Nathan, 2002**).

- **Inflammation chronique**

Définie comme une inflammation de durée prolongée, due à la persistance du ou des facteurs d'agression. Elle peut suivre l'inflammation aiguë ou débiter de façon insidieuse sous forme d'une réponse de faible intensité, souvent asymptomatique (**Medzhitov, 2008**).

### **I.1.2.3. Anti-inflammatoires**

Ce sont des médicaments qui antagonistes les processus inflammatoires, ils sont répartis en deux grands groupes :

- **Anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS)**

Les AINS sont les produits les plus fréquemment utilisés pour traiter l'inflammation. Ils sont définis comme étant la classe de médicaments qui possède les mêmes propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques) de l'acide acétylsalicylique (Aspirine). Le traitement par les AINS provoque l'inhibition de la voie de la COX ; et par conséquent la réduction de la production des prostaglandines et la diminution de la perméabilité vasculaire (**Lüllman et al., 2001**).

- **Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS)**

Les AIS constituent une vaste famille de médicaments dérivés de cortisol, principal les glucocorticoïdes. Ils sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire, qui résulte de leur capacité d'action sur la majeure partie des cellules impliqués dans la réaction inflammatoire et sur la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation (**Russo-Marie et al., 1998**).

### **I.1.3. Activité analgésique**

#### **I.1.3.1. Douleur**

La douleur est un problème clinique complexe subjectif, c'est l'un des symptômes de la réaction inflammatoire. Il s'agit d'une expérience sensorielle et émotionnelle correspondant à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou encore à une sensation subjective toujours désagréable, d'intensité variable d'un sujet à un autre (**Backonja, 2003**).

#### **I.1.3.2. Analgésiques**

Les analgésiques sont des médicaments à action symptomatique qui atténuent ou abolissent les sensations douloureuses sans agir sur la cause de la douleur (**Penn, 1995**). Les analgésiques sont généralement répartis en deux classes :

- **Analgésies périphériques**

Au sein du système périphérique, la douleur constitue un signal d'alarme qui protège l'organisme. Elle due à la libération de la sérotonine, de l'histamine, de la bradykinine, et des prostaglandines. Ces médiateurs chimiques stimulent les neurones nociceptifs périphériques et induisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire (**Frederico et al., 2009**). Les analgésiques périphériques constituent le groupe des analgésiques non morphiniques. Le

mécanisme d'action de ces produits est lié à l'inhibition des cyclooxygénases, ce qui aboutit à la diminution de la synthèse des médiateurs chimiques (**Kresec et al., 2007**).

- **Analgésiques centraux**

Les analgésiques centraux communément appelés analgésiques morphiniques. Ces produits agissent sur la première synapse de la douleur qui se trouve au niveau de la corne postérieure de la substance grise de la moelle épinière. A ce niveau ils inhibent la transmission de l'influx nerveux en se fixant sur la substance P de la synapse (**Stein et al., 1995**).

### **I.1.3.3. Activité analgésique des polyphénols**

Les polyphénols peuvent agir aussi bien comme analgésique périphérique et ceci en inhibant les COX ou les prostaglandines comme les AINS ou central en diminuer la sensibilité des terminaisons des fibres nerveuses aux stimuli nociceptifs (**Ahmed et al., 2010 ; Shakeri et al., 2012**).

## I.2. Etude de la toxicité

### I.2.1. Définition

Il a admis qu'une substance est toxique après pénétration dans l'organisme, par quelque voie que ce soit, à une dose relativement élevée en une ou plusieurs fois très rapprochées, ou par petites doses répétées, elle provoque immédiatement ou à terme de façon passagère ou durable des troubles d'une ou plusieurs fonctions de l'organisme (**Gomes et al., 2012**).

### I.2.2. Essais de la toxicité

L'évaluation de l'innocuité d'une substance débute souvent par des essais *in vitro* et *in vivo* sur des cultures cellulaires ou sur des animaux de laboratoire (souris, rats, lapins...). On distingue classiquement quatre formes essentielles de toxicité selon la fréquence et la durée de l'exposition (tableau I).

**Tableau I** : Les formes d'intoxication (**Lapointe, 2004**).

Formes d'intoxication	Fréquence d'administration	Durée d'exposition
Aiguë	Unique	< 24 heures
Subaiguë	Répétée	≤ 1 mois
Subchronique	Répétée	de 1 à 3 mois
Chronique	Répétée	> 3 mois

### I.2.3. Toxicité aigüe

Cette forme de toxicité est en général la première étude réalisée sur une substance lorsqu'il n'existe aucune notion ou seulement des notions très théoriques sur sa toxicité. Elle consiste à déterminer la dose létale 50 (DL<sub>50</sub>), où la dose capable de tuer en fonction de la voie d'administration choisie, la moitié des animaux mis en expérience (**Lapointe, 2004**). Cette dose (DL<sub>50</sub>) permet d'identifier les symptômes de l'intoxication. Les différentes classes de la toxicité aigüe sont illustrées dans le tableau II.

**Tableau II** : classification de la toxicité aigüe (**Viau et Tardif, 2003**).

Toxicité	Dose létale 50 (DL <sub>50</sub> )
Extrêmement toxique	DL <sub>50</sub> < 5 mg/kg
Très toxique	5 mg/kg < DL <sub>50</sub> < 50 mg/kg
Toxique	50 mg/kg < DL <sub>50</sub> < 500 mg/kg
Peu toxique	0,5 g/kg < DL <sub>50</sub> < 5 g/kg
Faiblement toxique ou non toxique	DL <sub>50</sub> > 5 g/kg

#### **I.2.4. Toxicité subaiguë**

La toxicité subaiguë regroupe l'ensemble des effets liés à des expositions répétées, quotidiennes ou périodiques, son objectif n'est pas de déterminer les doses létales, mais plutôt de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et ou anatomopathologiques consécutives aux administrations répétées et d'établir les conditions d'apparition de ces altérations en fonction de la posologie. Les effets toxiques peuvent se traduire dans ce cas par la mortalité, des modifications du comportement, de la consommation de nourriture ou d'eau, du gain de poids corporel, du poids relatif des organes ou des changements dans les niveaux des paramètres hématologiques et biochimiques (**Gomes *et al.*, 2012**).

### I.3. Plante *Pinus halepensis* Mill

#### I.3.1. Description botanique

##### a. Genre *Pinus*

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

##### b. Espèce *Pinus halepensis* Mill

Le pin d'Alep est un arbre toujours vert et vivace (figure 03) de hauteur qui dépasse vingt mètre. Il est doté d'un tronc tortueux, couvert d'une écorce épaisse et crevassée. Son écorce gris argenté et lisse tournant à la brune rougeâtre avec l'âge. Ses aiguilles ont une couleur de vert jaunâtre, elles sont molles, lisses, et fines de 0,7 mm de diamètre, et de 6 à 10 cm de long (**Nahal, 1962**). Ses cônes sont ovoïdes, aigues, de couleur brun luisant, portés par un pédoncule épais constamment recourbé, de 5 à 12 cm de long sur 4 de large, restant trois ans sur l'arbre (**Grossenbacher, 2011**). Ses grains s'échappent au cours du mois de juillet, août de la troisième année d'apparition du cône (**Kadik, 1987**). De couleur gris argenté et lisse chez les jeunes arbres, puis brune rougeâtre, en caille mince et large chez les plus âgés (**Nahal, 1962**).

- **Taxonomie et systématique**

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

**Règne :** Plantae

**Embranchement :** Spermaphyte

**Sous embranchement :** Gymnosperme

**Classe :** Coniférophyte

**Ordre :** Coniférale, Pinoidine, Pinale

**Famille :** Pinaceae (Abietaceae)

**Genre :** *Pinus*

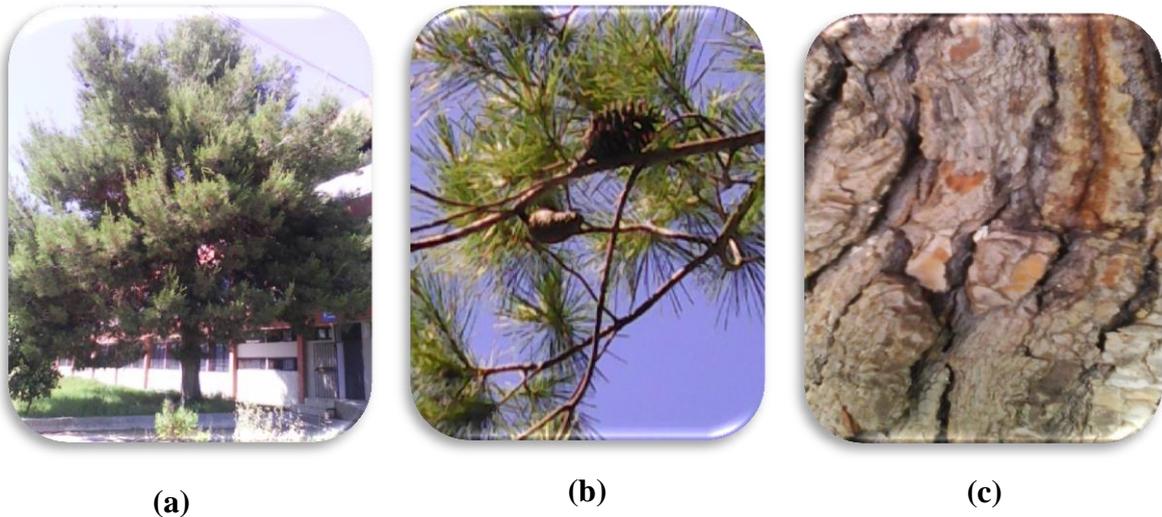
**Espèce :** *Pinus halepensis* Mill

- **Noms vernaculaires**

**Français :** Pin d'Alep, Pin blanc, Pin de Jérusalem (**Nahal, 1962**)

**Arabe :** Sanawbar halabi

**Berbère :** Azoumbei, tayada



**Figure 03:** Photographie originale de l'arbre de *Pinus halepensis* (a), des cônes (b), de l'écorce (c).

### **I.3.2. Résine de *Pinus halepensis***

#### **a. Définition**

La résine est le principal produit de cette espèce. Elle s'écoule d'abord fluide, puis se concrète en s'oxydant en masses solides cassantes jaunâtres et translucides insolubles dans l'eau mais solubles dans l'alcool, fusibles mais non volatiles (**Modugno et al., 2009**).

#### **b. Récolte de la résine**

La récolte est principalement au printemps se fait manuellement à l'aide d'un couteau et ensuite mise dans des sachets en plastique ou bien dans des sachets en papier ou dans des boîtes à matière variable (métal, porcelaine, verre, plastique). La résine pure sans brin de bois du tronc ou des branches se conserve seule pour usage interne, tandis que la résine prélevée avec des morceaux de bois est destinée à l'usage externe. Elle se conserve facilement et pour de longue durée (**Boulâcheb, 2009**).

### I.3.2.1. Données pharmacologique

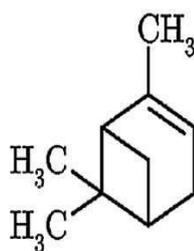
La résine de l'espèce *Pinus halepensis* est très connue pour ses propriétés en médecine traditionnelle Algérienne comme antiseptique puissant à action dynamisant. Pour l'usage externe elle est mélangée soit à l'huile d'olive soit au miel et en suite s'applique sur la poitrine et le dos ou sur les parties infectées pour la prévention et le traitement des maladies infectieuses respiratoires, pulmonaires, la grippe, la sinusite, les rhumatismes et les maladies infectieuses fongiques. Pour l'usage interne les formes habituelles d'administration de la résine du pin sont en poudre avec du miel ou en liquide avec l'huile d'olive une fois par jour contre les maladies respiratoires (**Boulâacheb, 2009**).

### I.3.2.2. Composition chimique

Elles correspondent à des mélanges liposolubles de composés terpénoïdes volatils et/ ou non volatils et de composés phénoliques qui sont sécrétés dans les structures spécialisées localisées à l'intérieur ou à la surface des organes de la plante (**Langenheim, 2003**).

#### a)- Résines terpéniques

De la résine du *Pinus halepensis* on tire les monoterpènes, ainsi que la térébenthine qui se caractérise par un pourcentage élevé en  $\alpha$ -pinène. L'essence de térébenthine qui a pourvu de 89% de  $\alpha$ -pinène (figure 04), a montré une bonne activité antibactérienne et antifongique (**Ghanmi et al., 2007**).



**Figure 04** : structure chimique d' $\alpha$ -pinène (**Hmiril et al., 2011**).

#### b)- Résines phénoliques

Les résines phénoliques constituent une source importante de biomasse pour des fuels et entrent souvent dans la composition de remèdes employés en médecine traditionnelle. Leurs constituants dérivent d'hydrates de carbone produits au cours de la photosynthèse et les diverses voies métaboliques (**Langenheim, 2003**).

## *Partie expérimentale*

# *Matériel et méthodes*

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur la résine de *Pinus halepensis* Mill, elle est appelée communément gomme et localement Imatawene ozoumbei. Un échantillon de plante a été déposé au niveau du laboratoire de Botanique de Dr Bouadam (U.A.M.B) pour son identification.

### II.1.2. Animaux et conditions d'élevage

Des souris NMRI et Balb/c, mâles et femelles, dont le poids varie entre 25 et 30g, ont été utilisées lors de l'étude *in vivo* (provenant de l'animalerie de l'institut de Pasteur d'Alger). Les animaux ont un accès libre à la nourriture (granulés d'origine commerciale, fourni par ONAB (Bejaia) et reçoivent de l'eau « *ad libitum* ». Ils sont maintenus dans une animalerie à température constante ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ) et soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Les animaux sont placés dans des cages en matière plastique, munies de biberons, et une épaisse couche de sciure est déposée au fond des cages et renouvelée tous les 2 à 3 jours. Après une période d'adaptation de 2 semaines au niveau de l'animalerie, les souris ont été assignées en groupes de  $n=6$ .

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Préparation d'extrait phénolique

#### ➤ Récolte

La résine du *Pinus halepensis* a été récoltée dans la wilaya de Bejaia durant le mois d'Aout 2016, pour éviter la technique du gemmage qui consiste à faire des incisions latérales de l'écorce (figure 05).

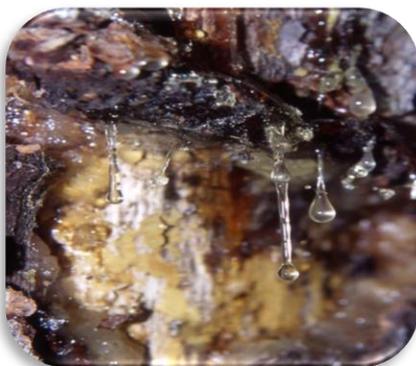


Figure 05 : Photographie de la résine de *Pinus halepensis* (Anonyme).

### ➤ Séchage et broyage

La résine est séchée à l'air libre pendant quelques jours (figure 06) et réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique puis conservée soigneusement, à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'au jour de la préparation de l'extrait.



**Figure 06:** Photographie de la résine sèche de *P. halepensis*

### ➤ Tamisage

Le broyat de résine a été tamisé à travers des tamis de différentes granulométries, afin de récupérer une poudre très fine de granulométrie inférieure à 125µm.

## II.2.2. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est réalisée suivant le protocole de **Romani et al. (2006)**. Cinquante grammes du broyat obtenu de résine ont été macérés dans 500 ml d'éthanol (95%) pendant 24 heures sous agitation. La suspension obtenue a subi une décantation pendant 24 heures, afin de récupérer le surnageant. Ce dernier a été séché à l'étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le taux d'extraction a été évalué comme suit :

$$\text{Taux d'extraction} = [(P1 - P0) / E] \times 100$$

Où :

**P1** : poids d'extrait après évaporation du solvant (g).

**P0** : poids vide du cristalliseur ou boîte de pétri (g).

**E** : poids de la poudre (g).

### II.2.3. Criblage phytochimique

Afin de tenter d'établir la composition phytochimique de l'extrait, divers dosages ont été réalisés.

#### II.2.3.1. Dosage des phénols totaux

L'estimation de la teneur en composés phénoliques a été réalisée selon la méthode au Folin-Ciocalteu utilisée par **Kähkönen et al. (1999)**. Un volume de 200µl d'extrait (100µg/ml) et 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ont été introduit dans un tube de centrifugation et additionnés de 0,8 ml de carbonate de sodium (0,7 %). Le mélange a été vortexé puis incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. Les absorbances ont été mesurées à 765nm contre un blanc sans extrait. Les teneurs en polyphénols totaux ont été déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage effectuée dans les mêmes conditions de dosage (annexe 1), et exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/ gE).

#### II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis* a été effectuée selon la méthode du trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) (133mg d' $AlCl_3$  et 400 mg de  $CH_3CO_2Na$  (acétate de sodium) dans 100 ml d'eau distillée) (**Maksimović et al., 2005**) basée sur la formation du complexe de flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium par chélation des métaux. 2 ml d'extrait (100 µg/ml) sont mélangés avec 1 ml de la solution de trichlorure d'aluminium. Après incubation pendant 10 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 430 nm. Les concentrations en flavonoïdes ont été déterminées grâce à une courbe d'étalonnage (annexe 2) et exprimées en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/ gE).

#### II.2.3.3. Dosage des tannins condensés

La méthode est basée sur l'interaction de la vanilline (un aldéhyde aromatique) avec les proanthocyanidines (tous les flavanol-3) donnant ainsi un complexe coloré rouge qui est quantifié spectrophotométriquement à 500 nm. Le dosage des proanthocyanidines a été réalisé suivant la méthode de **Swain et Hillis. (1959)** ; 1ml d'extrait (100 µg/ml) a été additionné à 2 ml de la solution de la vanilline (1g de la vanilline dans 100 ml d'acide sulfurique à 70%). Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min. Le complexe rouge ainsi obtenu, est mesuré spectrophotométriquement à 500nm. La teneur en

proanthocyanidines a été estimée par rapport à une courbe d'étalonnage (annexe 3), en utilisant la catéchine comme référence et exprimée en mg d'équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EC/ gE).

#### **II.2.4. Tests *in vitro* : Etude de l'activité antioxydante**

Afin d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis*, deux méthodes ont été adaptées à savoir : Le pouvoir réducteur et l'activité scavenging de radical DPPH.

##### **II.2.4.1. Pouvoir réducteur**

Ce pouvoir mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  ( $FeCl_3$ ) en fer ferreux  $Fe^{2+}$  ( $FeCl_2$ ) en présence d'un agent chromogène ferricyanure de potassium K3 [ $Fe(CN)_6$ ]. Ceci se traduit par le virage de la couleur jaune de ferricyanure de potassium vers une couleur bleu verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant (**Gulçin et al., 2005**).

Le pouvoir réducteur de l'extrait phénolique a été déterminé selon la méthode de **Yildirim et al. (2001)**. Un volume de 1 ml d'extrait (100µg/ml) est additionné à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH=6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium K3 [ $Fe(CN)_6$ ] à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min, puis 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés au mélange avant d'être centrifugé à 3000 tours par min pendant 10 minutes. Un volume de 2,5 ml du surnageant a été mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique (0,5%) dans des tubes à essai. L'absorbance a été mesurée à 700 nm.

### II.2.4.2. Activité scavenging de radical DPPH

Le DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl) radical libre, stable et caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm (**Brand-Williams et al., 1995**). La substance antioxydante agit en transférant un électron ou un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration au jaune pâle. Ce passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH (**Molyneux, 2004**).

L'activité scavenging de l'extrait phénolique a été déterminée spectrophotométriquement en utilisant la méthode de **Balasundrum et al. (2007)**. 300 µl d'extrait ou de molécules de références sont ajoutés à 1 ml de la solution DPPH préparée à  $6 \cdot 10^{-5}$  M dans du méthanol. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le pourcentage de l'activité scavenging de radical DPPH a été calculé comme suit :

$$\% \text{ activité scavenger de radical DPPH} = [A_C - (A_E - A_B) / A_C] \times 100$$

Où :

$A_C$  : Absorbance du DPPH (absorbance du témoin DPPH- absorbance du méthanol)

$A_E$  : Absorbance de la solution DPPH et de l'extrait.

$A_B$  : Absorbance du blanc de l'extrait sans DPPH.

## II.2.5. Tests in vivo : Etude toxicologique et pharmacologique

### II.2.5.1. Etude de la toxicité aigue

Afin de déterminer la toxicité aigüe par voie orale des extraits éthanoliques de résine de *Pinus halepensis*, la méthode décrite par **Haider et al. (2011)** a été utilisée avec quelques modifications. Des souris Balb/c mâles et femelles ont été réparties de façon homogène en 5 groupes (n=6). Après une nuit de jeune, l'administration de différentes doses d'extrait ont été effectuées en une seule dose (10ml/kg par souris) et par voie intra-gastrique pendant 7 jours.

- **Lot témoin:** a reçu la solution physiologique (NaCl 0,9%).
- **Lot traités (II, III, IV et V) :** ont reçu respectivement les doses 100, 500, 1000 et 3000 mg/kg de l'extrait de résine solubilisés dans une solution de DMSO (1%) diluées dans du NaCl (0,9%).

### II.2.5.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis*, deux modèles d'inflammation aigue ont été utilisés dans les tests *in vivo*.

#### a. Œdème de l'oreille induit par le xylène

L'œdème de l'oreille induit par le xylène a été effectué, selon la méthode d'**Atta and Alkofahi. (1998) in Bagad et al. (2013)**. Pratiquement, une inflammation cutanée a été induite sur la face interne et externe de l'oreille droit de chaque souris, et ceci par l'application locale de 50 µl d'une solution de xylène pure. Les souris ont été répartis en 03 groupes de 6 souris chacun, et ont reçu respectivement les traitements suivants par voie intra-gastrique 60 min avant l'application de xylène.

- **Lot témoin :** a reçu de l'eau physiologique 0,9% (10ml/kg).
- **Lot de référence :** recevant la solution de diclofénac à 50mg/kg (10ml/kg).
- **Lot traité :** traité avec une solution de l'extrait de la résine à tester à une concentration de 200mg/kg dissout dans DMSO (1%) diluée avec du NaCl 0,9% (10ml/kg).

Après quatre heures de traitement, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale après anesthésie au chloroforme, des disques de 6mm ont été prélevés de l'oreille droit (avec l'œdème) et ont été pesées et comparées à celles récupérées de l'oreille gauche (sans l'œdème) (figure 07).



**Figure 07 :** Œdème de l'oreille droite induit par le xylène.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par la détermination de pourcentage d'inhibition de l'œdème calculé par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\Delta O \text{ témoin} - \Delta O \text{ traité}) / \Delta O \text{ témoin} \times 100$$

Où :

$\Delta O$  : Différence du poids de l'œdème inflammatoire.

#### **b. Œdème plantaire induit par la carragénine**

L'œdème plantaire induit par la carragénine a été réalisé selon la méthode décrite par **Winter et al. (1962)**. L'inflammation aigüe est induite par l'injection sous cutané de 50  $\mu$ l de la solution de carragénine à 1% (dans du NaCl 0,9%) dans la patte arriérée gauche de la souris. Les souris ont été répartir en 3 lots, comme suit :

- **Lot témoin** : a reçu de l'eau physiologique (NaCl 0,9%)
- **Lot de référence** : a reçu la solution de diclofénac (un anti-inflammatoire de référence) à une concentration de 50mg/kg (Dans NaCl 0,9%).
- **Lot traité** : a reçu l'extrait de la résine à tester à raison de 200mg/kg dissout dans DMSO (1%) diluées avec du NaCl 0,9%.

La mesure des volumes en (ml) de la patte arrière gauche de chaque souris a été effectuée avant l'induction de l'œdème et à chaque heure durant une période de 6h après l'injection de la carragénine. Le volume de la patte a été mesuré en utilisant un pléthysmomètre (figure 08). L'immersion de la patte provoque le déplacement d'un volume d'eau qui correspond au volume de celle-ci.



**Figure 08** : Œdème plantaire induit par la carragénine : A) Injection de la carragénine au niveau de la patte arriérée gauche de la souris, B) Mesure du volume de la patte de souris par le Pléthysmomètre.

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traité par rapport au contrôle selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(V_n - V_o) \text{ témoins} - (V_n - V_o) \text{ traité}] / (V_n - V_o) \text{ témoins} \times 100$$

Où :

$V_n$  : Le volume moyen mesuré aux heures de 1 à 6 heures après l'injection de la carragénine.

$V_o$  : Le volume moyen mesuré avant l'injection de la carragénine.

### II.2.5.3. Evaluation de l'activité anti-nociceptive

Afin de réaliser cette étude et de déterminer le mode d'analgésie deux tests ont été sélectionnés.

#### a. Test de contorsions

L'évaluation de l'activité analgésique périphérique a été étudiée selon la méthode basée sur l'injection intra-péritonéale de l'acide acétique (0,6%), provoquant des contractions abdominales, des mouvements d'étirement du corps et des pattes postérieures et une torsion des muscles dorso-abdominales (Ishola *et al.*, 2011). Les souris ont été réparties en trois groupes de 6 souris chacun et ont reçu respectivement les traitements suivants par voie orale une heure avant l'injection d'acide acétique.

- **Lot témoin** : reçoit une solution de véhicule (NaCl 0,9%) (10ml/kg).
- **Lot de référence** : reçoit de l'aspirine à 100 mg/kg (10 ml/kg).
- **Lot traité** : a reçu une solution de l'extrait de résine à tester à une concentration de 200mg/kg dissout dans DMSO (1%) diluées avec du NaCl 0,9% (10ml/kg).

Les souris ont été placées individuellement dans des cages et le nombre d'étirement ou de contractions abdominales (figure 09) pour une période de 30min a été déterminé pour chaque souris après un temps de latence de 5min suite l'injection.



**Figure 09:** Etirement des pattes postérieures et contractions des muscles abdominales.

L'activité anti-nociceptive de l'extrait phénolique et du standard testés a été exprimée en pourcentage de réduction des moyennes des torsions abdominales, calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{MT témoin} - \text{MT traité}) / \text{MT témoin} \times 100$$

Où :

MT : Le nombre moyenne des torsions.

#### **b. Test d'immersion de la queue**

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité analgésique centrale est celle décrite par d'Amour et smith (1941) in (Arslan et al., 2015). Ce test fait intervenir une réponse comportementale de la souris suite à un stimulus thermique engendré par l'immersion du bout de la queue de l'animal (environ 2 cm) dans de l'eau chaude maintenue à environ 55°C (figure 10), dont le principe est de mesurer le temps de réaction (temps de latence) qui correspond au temps de retrait de la queue de l'eau chaude. Afin

d'éviter des brûlures, seules les souris dont la réponse s'observe avant 10 secondes ont été sélectionnées pour l'étude.



Figure 10 : Immersion de la queue dans l'eau chaude

Un groupe de souris a été réparti aléatoirement en 03 groupes de 06 souris chacun, et la mesure de temps de réponse a été enregistrée 30 minutes après l'administration orale des traitements.

- **Lot témoin** : a reçu de l'eau physiologique 0,9% (10ml/kg).
- **Lot de référence** : recevant la solution d'acide acétylsalicylique à 100mg/kg (10ml/kg).
- **Lot traité** : traité avec une solution de l'extrait de la résine à tester à une concentration de 200mg/kg dissout dans DMSO (1%) diluées avec du NaCl 0,9% (10ml/kg).

Au total, trois essais ont été réalisés par intervalle de 30 min pendant 180min, un essai de contrôle à 0 min avant l'administration de différents traitements. Le pourcentage d'inhibition de la douleur (PID) a été calculé comme suit :

$$\text{PID (\%)} = (T_1 - T_0) / T_1 \times 100$$

Où :

T<sub>0</sub>: Temps de latence avant le traitement (à 0 min).

T<sub>1</sub> : Temps de latence après le traitement (à 30, 60, 90,120 et à 180 min).

### **II.3. Etude statistique**

Les tests d'évaluation de l'activité antioxydante ainsi que le criblage phytochimique sont exprimées par la moyenne de trois essais  $\pm$  écart type. Par contre les données de la partie *in vivo* ont été réalisées sur des lots de 6 souris et les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM (standard error of mean). L'analyse statistique des résultats est effectuée en utilisant le logiciel Graph Pad Prism et les différences sont considérées significatives pour  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

## *Résultats et discussion*

### **III. Résultats et discussion**

#### **III.1. Taux d'extraction et analyse phytochimique**

##### **III.1.1. Taux d'extraction**

Les procédés d'extraction des antioxydants phytochimiques à partir des plantes médicinales constituent une étape cruciale, car elle est déterminante de la qualité et de la quantité de principes actifs recherchés, qui reflètent directement leurs activités pharmacologiques.

Considérant la diversité et les propriétés structurales complexes de ces composés, notamment les composés phénoliques, il est impossible de mettre au point des méthodes exhaustives pour leur extraction. Ainsi, les conditions de l'extraction, à savoir le type du solvant, la taille des particules, l'état du matériel végétal (sec ou frais) et les conditions thermiques de l'extraction peuvent influencer significativement le taux et la nature des composés extraits (**Naczki et Shahidi, 2006 ; Lim et Murtijaya, 2007**).

Dans notre cas, après le séchage de la résine à l'air libre, nous avons procédé au broyage et tamisage de la matière végétale de façon à pouvoir récupérer la poudre la plus fine possible ayant un diamètre inférieur à 125 $\mu$ m, pour augmenter la surface de contact avec le solvant et améliorer le rendement de l'extraction. D'après **Lim et Murtijaya (2007)**, le taux d'extraction des principes actifs est inversement proportionnel avec la taille des particules obtenues après le broyage.

L'utilisation de l'éthanol comme solvant d'extraction présente plusieurs avantages : Sa polarité fait qu'il est utilisé comme solvant par excellence pour l'extraction des composés phénoliques ; d'autre part il est moins altérant que le méthanol, qui peut exercer un effet de méthanolyse sur les tannins, pouvant perturber la teneur réelle des extraits en ces composés (**Bruneton, 1999 ; Mueller-Harvey, 2001**).

L'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* présente un taux d'extraction de 27,05 % (tableau III). Ce résultat présume, au préalable, la richesse de la résine en composés phénoliques.

**Tableau III:** Taux d'extraction et dosage des composés phénoliques

Taux d'extraction (%)	Phénols totaux (mg EAG/g E)	Flavonoïdes (mg EQ/ g E)	Tanins condensés (mg EC/g E)
27, 05%	232 ± 12,72	91,81 ± 2,66	607,73 ± 19,28

### III.1.2. Dosage des composés phénoliques de la résine de *P. halepensis*

Les concentrations des phénols totaux, des flavonoïdes et les tannins condensés sont déterminées à partir des courbes d'étalonnages ( $y = 0,005x+0,115$  ;  $R^2 = 0,991$ ) (annexe 1), ( $y = 0,022x+0,087$  ;  $R^2 = 0,997$ ) (annexe 2) et ( $y = 0,003x+0,02$  ;  $R^2 = 0,995$ ) (annexe 3) tracées en utilisant comme standard l'acide gallique, la quercétine et la catéchine, respectivement. Les concentrations sont exprimées en mg EAG/ gE pour les phénols totaux, en mg EQ/ gE pour les flavonoïdes et en mg EC/ gE pour les proanthocyanidines. La principale raison pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

Les résultats de la teneur en phénols totaux, flavonoïdes ainsi que en tannins condensés sont illustrés dans le tableau III. D'une manière générale, on constate que l'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis* constitue une source importante en composés phénolique. Des teneurs relativement élevées ont été enregistrées en phénols totaux ( $232 \pm 12,72$  mg EAG/ gE), en flavonoïdes ( $91,81 \pm 2,66$  mg EQ/ gE) et en proanthocyanidines ( $607,73 \pm 19,28$  mg EC/ gE), confirmant ainsi ce qu'a été déjà supposé concernant sa richesse en composés phénoliques.

Selon l'étude menée par **Kadri et al. (2014)** faite sur les graines de *Pinus halepensis* (pin Algérien), les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes trouvées dans l'extrait méthanolique (50%) sont de 3, 71 mg EAG/ gE et 0,80 mg EQ/ gE, respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues avec cette étude. La répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une plante a été rapportée par **Bruneton. (2008)**. Par contre, **Lantto et al. (2009)** ont révélés une teneur élevée en phénols totaux (266 mg EAG/ gE) dans l'extrait acétonique des graines de *P. halepensis* (pin Sibérien).

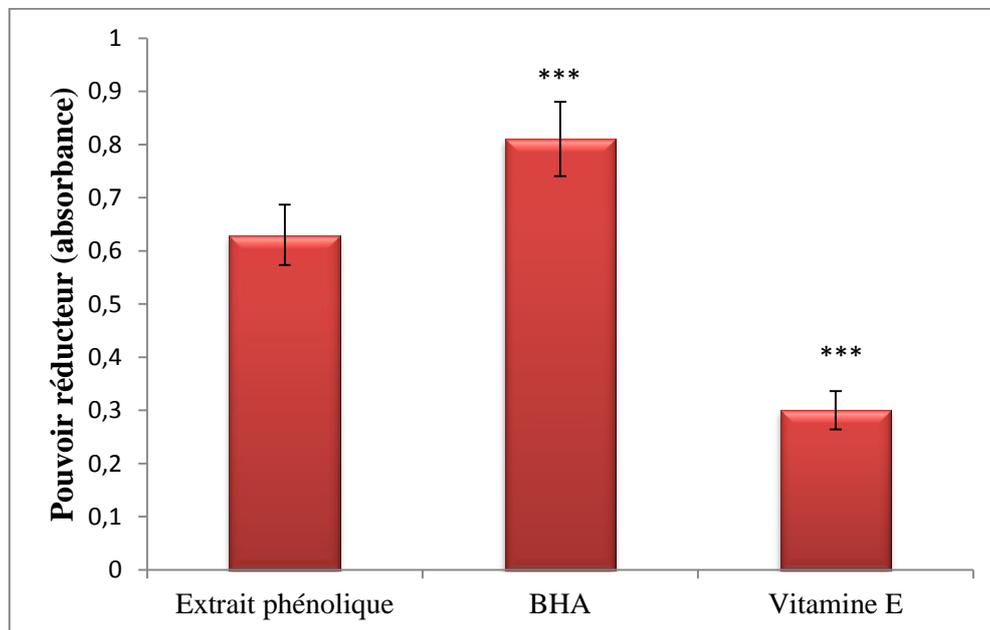
Cette différence trouve probablement son explication dans la différence d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques à savoir les conditions de croissance, le processus de maturation, les techniques d'échantillonnage et les conditions de stockage (**Bergonzi et al., 2001 ; Wang and Zheng,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

## III.2. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

De nombreuses méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro*. Ces méthodes se basent exclusivement sur la capacité réductrice ou de piégeage des radicaux comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant (Marc *et al.*, 2004). Les activités antioxydantes de la résine de *P.halepensis* ont été menées par deux tests complémentaires : piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> et mesure du pouvoir réducteur.

### III.2.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est souvent employé comme indicateur de la capacité d'un échantillon à réduire un oxydant en lui cédant un électron (Tepe *et al.*, 2005). Dans ce test, la présence des réducteurs dans l'extrait provoque la réduction de Fe<sup>3+</sup>/ complexe ferricyanide à la forme ferreux Fe<sup>2+</sup>. Par conséquent, Fe<sup>2+</sup> peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm. Le pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique de l'extrait phénolique de la résine et des standards le BHA et la vitamine E a été évalué à une concentration de 100 µg/ml (figure 11).



**Figure 11:** Evaluation du pouvoir réducteur des extraits phénoliques de la résine de *P.halepensis* et des standards à 100 µg/ml.

-Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart-type.

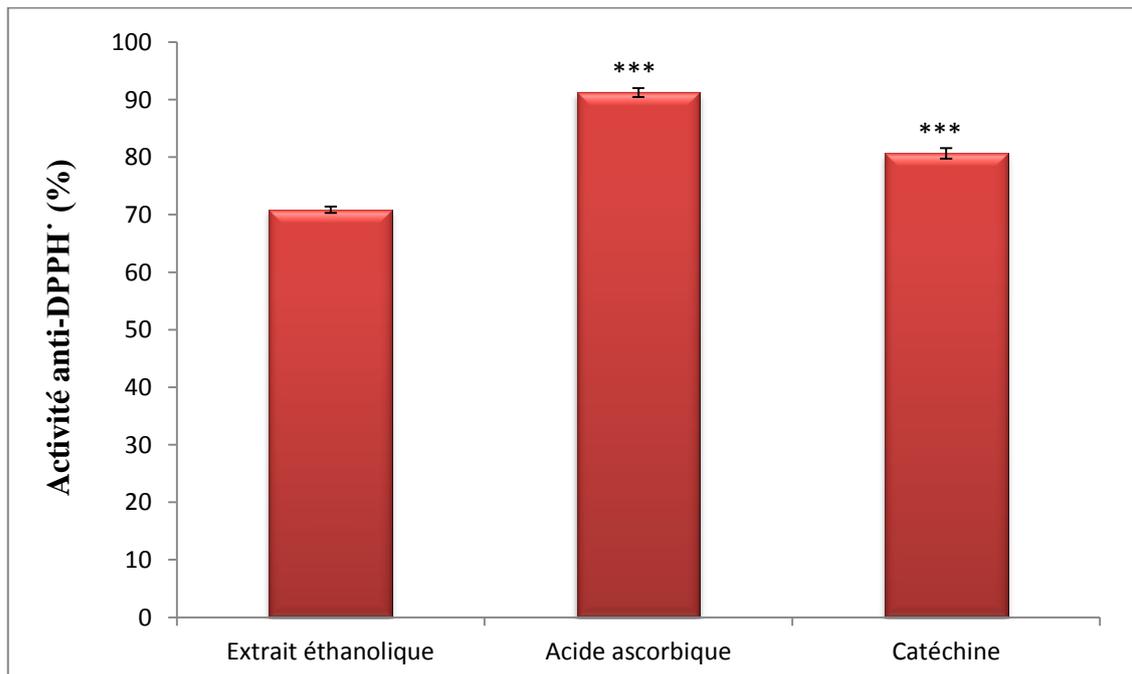
- \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05, en comparaison les données de chaque colonne (test de Newman-Keuls).

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis* a exhibé une activité réductrice importante. Avec un pouvoir de 0,63 UI, qui est supérieur à celle obtenu avec la vitamine E. Le BHA a montré le plus fort pouvoir réducteur. Ces variations pourraient être attribuées aux facteurs structuraux des différents antioxydants (Alonso et al., 2000).

### III.2.2. Effet scavenger contre le radical DPPH

Dans la présente étude, la méthode au DPPH a été utilisée afin de déterminer l'activité anti-radicalaire de l'extrait phénolique de résine de *P.halepensis* Mill. Ce test est basé sur la capacité des antioxydants à piéger les radicaux en réduisant le DPPH par un transfert d'hydrogène (Elmastas et al., 2006).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire de l'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis* et des standards exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans la figure 12.



**Figure 12:** Evaluation de pouvoir anti-radicalaire au DPPH d'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis* et des standards à 100 µg/ml.

-Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne de trois essais ± écart-type.

- \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05, en comparaison les données de chaque colonne (test de Newman-Keuls).

En analysant les résultats de la figure 12, on constate qu'à la concentration de 100µg/ml, l'extrait de la résine a exhibé de puissant effet scavenger contre ce radical, avec un pourcentage d'inhibition de 70,86%, inférieur ( $p < 0,001$ ) aux effets des molécules de références, l'acide ascorbique (93,15%) et la catéchine (81,32%).

D'après ces résultats, on peut constater que l'activité scavenging du DPPH des de l'extrait de la résine pourrait être attribuée à leurs teneurs élevées en composés phénoliques. Aussi, il a été rapporté que l'activité anti-radicalaire dépend de la structure chimique des composés phénoliques et de la disponibilité en groupements hydroxyles (OH) qui leur attribue la capacité de transférer des électrons ou de donner des hydrogènes (Jayaprakasha *et al.*, 2008).

### III.3. Etude de l'activité pharmacologique de la résine de *P.halepensis*

Suite aux résultats des analyses *in vitro* précédentes ayant révélé le potentiel antioxydant de l'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis* et sa richesse en polyphénols, nous avons entrepris à une étude toxicologique et pharmacologique.

#### III.3.1. Evaluation de la toxicité aiguë

En Algérie, plusieurs études déjà menées ont permis de découvrir que les tradithérapeutes emploient la résine de *P.halepensis* dans le traitement de plusieurs maladies (**Boulaacheb et al., 2010**). Eu égard à large utilisation de la résine dans notre médecine traditionnelle, une étude cytotoxique s'impose, pour optimiser son utilisation.

La toxicité aiguë par voie orale de l'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis* a été évaluée à des différentes concentrations à des souris mâles et femelles. Cette étude nous permettra de sélectionner les doses non toxiques à tester. Pour déterminer cette toxicité nous avons observé les souris 30 min tous les jours pendant 7 jours. L'appréciation des effets toxiques est faite sur la base de l'examen macroscopique, du comportement, de mortalité et d'asthénie par comparaison avec le lot control (Tableau IV).

Pendant toute la durée de l'étude, toutes les souris sont apparues en bonne santé. L'administration orale de l'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis* n'a pas montré d'effets ni sur le poids corporel, ni sur la consommation alimentaire ou la prise d'eau et n'a pas provoqué de changement du comportement.

Au terme de la présente étude, on déduit que l'extrait phénolique de la résine a été toléré chez les souris aux différentes doses utilisées et la DL<sub>50</sub> de ce dernier a été estimée supérieure à 2g/kg. Par conséquent, ces résultats montrent la totale innocuité de la résine de *P. halepensis*.

**Tableaux IV :** Résultats des observations du test de la toxicité aigüe de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis* chez les souris

Extraits	sexe	Asthénie	Mortalité	Convulsion	horripilation	Agitation	Salivation	Appétit	Soif	Poids corporel
100mg/kg	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	↑
	♀									
500mg/kg	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	↑
	♀									
1000mg/kg	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	↑
	♀									
2000mg/kg	♂	0	0	0	0	0	0	0	0	↑
	♀									

♂ : mâle, ♀ : femelle, 0 : aucun effet. ↑ Augmente

### III.3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Dans le but d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de la résine de *P. halepensis*, nous avons testé deux modèles d'inflammation aiguë chez la souris, le modèle de l'œdème de la patte induit par la carragénine et celui de l'oreille induit par le xylène.

#### III.3.2.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène

L'inflammation aiguë induite par le xylène est caractérisée par des symptômes classiques, comme la rougeur, la chaleur, le gonflement et la douleur. La mesure de l'œdème est donc un excellent outil pour la quantification de l'inflammation cutanée, induite par les agents phlogistiques comme le xylène. L'œdème de l'oreille induit par le xylène est une méthode largement utilisée pour étudier le processus inflammatoire de la peau, ainsi qu'identifier les agents anti-inflammatoires qui pourraient être utiles dans le traitement des troubles de la peau (Cabrini et al., 2011).

Le développement œdémateux ( $\Delta O$ ) induit par le xylène sur les différents groupes testés a été observé et pesé. Les différents résultats obtenus sont représentés dans le tableau V et mettant en valeur les moyennes du poids des oreilles et les pourcentages d'inhibition.

**Tableau V** : Effet de l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* et le diclofénac sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène.

Groupes	$\Delta O \pm SEM$ (mg)	% d'inhibition
Contrôle (NaCl 0,9%)	28,8 $\pm$ 2,58	-
Extrait phénolique (200 mg/ml)	20,2 $\pm$ 1,30 **	29,86 $\pm$ 1,12 ***
Diclofénac (50 mg/ml)	16,2 $\pm$ 1,64 ***	43,75 $\pm$ 2,08

-Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM pour n= 6.

- \*\*\* p< 0,001, \*\* p< 0,01, \* p< 0,05, par rapport au contrôle (test de Dunnett).

En examinant les résultats, on constate une augmentation du poids de l'œdème après l'application locale de xylène, les souris du groupe contrôle ont développé un œdème de l'oreille de 28,8  $\pm$  2,58 mg (tableau V). Chez les souris du groupe traité par l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis*, on remarque une réduction significative (p<0,01) de l'œdème de l'oreille par rapport à celle des souris du groupe contrôle, et qui passe de 28,8  $\pm$  2,58 à 20,2  $\pm$  1,30 mg ce qui correspond à une inhibition de l'inflammation de 29,86% (tableau V). L'administration du Diclofénac (50 mg/kg) au 2<sup>ème</sup> groupe, a exhibé

une diminution très significative ( $p < 0,001$ ) de l'évolution de l'inflammation par rapport aux souris du groupe contrôle, avec un pourcentage d'inhibition de 43,75%.

Le Diclofénac est un médicament qui appartient à la classe des anti-inflammatoire non stéroïdiens, doté de propriétés analgésiques et anti-inflammatoire en inhibant la COX (**Lüllmann et al., 2001**). Il est généralement utilisé dans les expérimentations animales dans l'étude de l'inflammation induite par divers agents phlogistique dans le but de comparer ses effets avec ceux des extraits de plantes ou de nouvelles substances synthétiques (**Ojewole, 2007**).

L'application topique de xylène induit une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par une vasodilatation, infiltration des leucocytes polynucléaires dans les tissus, une augmentation dans l'IL-1 $\beta$  et la formation de l'œdème. Comme elle augmente l'activité de la myeloperoxydase (**Ravelo- Calzado et al., 2011**). Aussi, d'autres études ont montrés que l'application de xylène favorise une augmentation de l'activité de la phospholipase A2 (PLA2) (**Bagad et al., 2013**). La PLA2 catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en acide arachidonique, ce dernier est impliqué dans la synthèse des prostaglandines et leucotriènes, ce qui constitue la première étape dans la réaction inflammatoire (**Zanini et al., 1992**).

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* révélée dans la présente étude pourrait être due à la richesse de cet extrait en composés phénoliques. En effet, la teneur élevée en tannins dans l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* est en partie responsable de cet effet. D'après **Kim et ses collaborateurs (2006)**, les tannins auraient un rôle anti-inflammatoire crucial, ces composés seraient capables de prévenir et/ ou d'atténuer les manifestations du processus inflammatoire, en agissant à différents niveaux. Ainsi l'acide gallique et ses dérivés auraient des vertus anti-inflammatoire en agissant sur la synthèse et/ ou la production de médiateurs inflammatoire tels que TNF $\alpha$ , et IL-6. En plus, la capacité des tannins d'inhiber la phospholipase A2 est déjà établie, ce qui va participer à l'inhibition de prostaglandines et des leucotriènes (**Da Silva et al., 2008**).

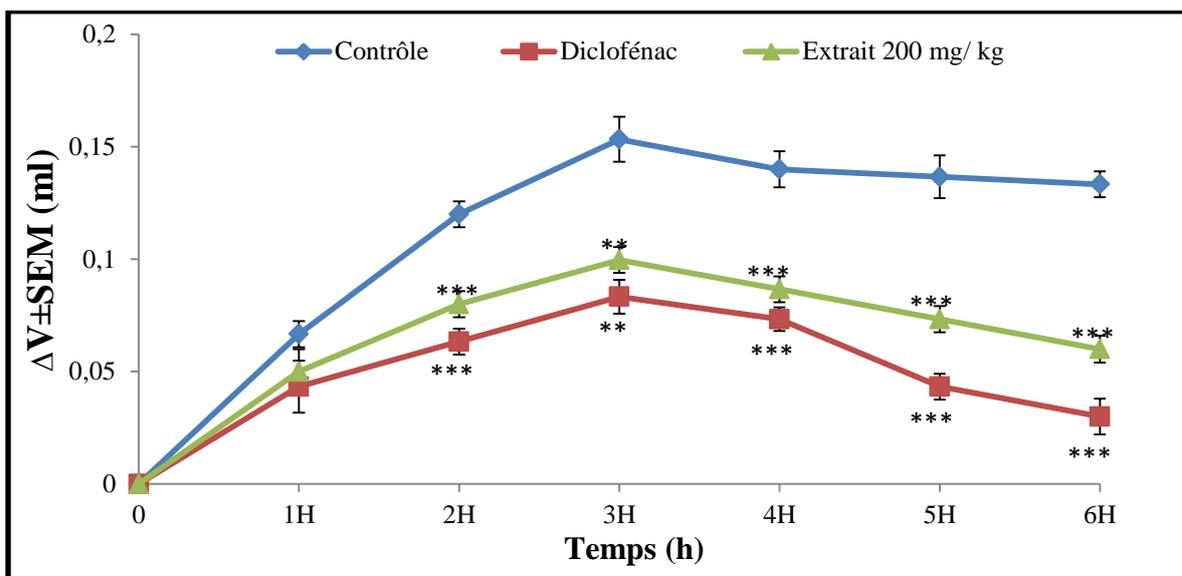
Selon **Conforti et ses collaborateurs (2008)**, la diminution de l'œdème de l'oreille est probablement due à la présence de composés dotés d'activité antioxydante comme l'anthocyanine, sachant que les espèces oxygénées réactives produites au cours de

l'inflammation par les cellules phagocytaires, et durant le métabolisme de l'acide arachidonique peuvent également activer la phospholipase A2 (Geronikaki *et al.*, 2006).

### III.3.2.2. Œdème plantaire induit par la carragénine

Le modèle de l'œdème aigu de la patte induit par la carragénine est l'un des protocoles phare d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des substances naturelles. Ce genre d'essai est en grande partie utilisé pour évaluer l'efficacité des médicaments de la classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est basée sur la mesure du volume de l'œdème de la patte avant et après l'injection de la carragénine chez les souris. Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'une courbe mettant en valeur l'évolution du volume de l'œdème en fonction de temps (figure 13).



**Figure 13:** Courbe d'évolution de la variation du volume de l'œdème inflammatoire ( $\Delta v$ ) en fonction du temps.

-Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM pour  $n=6$ .

- \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , par rapport au contrôle (test de Dunnett).

Les résultats obtenus montrent que toutes les souris injectées par la carragénine ont développé un œdème au niveau de la patte, dont le volume varie en fonction du temps. Pour l'ensemble des souris, l'œdème a augmenté pour atteindre un niveau maximum à la 3<sup>ème</sup> heure, en accord avec ceux rapporté par Zhu *et al.* (2011). L'évolution œdémateuse peut être divisée en deux phases :

De 0 à 3h : L'œdème provoqué chez les trois groupes expérimentaux augmente progressivement et atteint un volume maximal à 3h, cette augmentation est significative ( $p < 0,001$ ) chez le groupe contrôle.

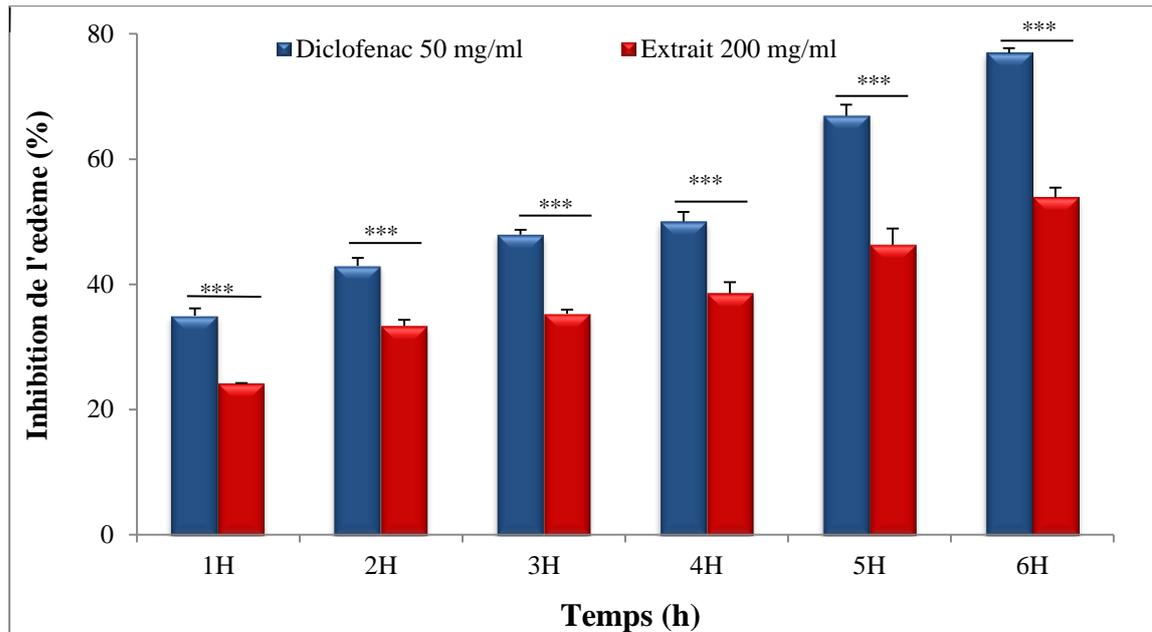
De 3 à 6h : le volume de la patte chez le lot témoin reste partiellement stable, tandis que chez les deux autres groupes expérimentaux entre dans la phase de déclin, avec une diminution significative ( $p < 0,001$ ) dans le groupe traité avec le Diclofénac à 50 mg/kg.

La diminution observée chez le lot témoin est certainement due aux mécanismes anti-inflammatoires naturels. L'organisme produit des rétrocontrôles négatifs à différents niveaux de la réaction inflammatoire, et ce en induisant l'expression de médiateurs anti-inflammatoires et la production d'hormones corticostéroïdiennes.

L'injection de la carragénine provoque une inflammation locale causée par une lésion tissulaire, qui résulterait de l'action de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire (**Onasanwo et al., 2012**). Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la première phase (0 à 3h) est due à libération de l'histamine et de la sérotonine, qui seraient responsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, ces changements hémodynamiques atteignent un niveau accru à la 3ème heure après l'injection de la carragénine puis elle commence à diminuer (**Sharififar et al., 2012**), et une deuxième phase (3 à 6h) caractérisée par la libération des prostaglandines et fait intervenir les bradykinines, les leucotriènes et les cellules polynucléaires (**Haider et al., 2011**).

L'évaluation du pourcentage d'inhibition (figure 14) révèle que l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* possède une activité anti-inflammatoire dès la première heure de l'expérience, pourrait s'expliquer par la présence de substances à action antagoniste à l'histamine, à sérotonine, à la bradykinines et à la biosynthèse des prostaglandines (**Onasanwo et al., 2012**).

L'analyse des résultats a montré que l'administration orale de l'extrait phénolique de la résine à une dose de 200 mg/kg a inhibé significativement l'œdème induit par l'injection de la carragénine avec des pourcentages de 24,24±1,02; 33,34±0,98; 35,29±0,68; 38,57±1,77; 46,32±2,57 et 53,84±1,6 respectivement à 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h.



**Figure 14 :** Inhibition de l'inflammation de l'œdème induite par la carragénine par l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis*.

-Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM pour  $n=6$ .

- \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , par rapport au Diclofénac (test de Dunnett).

L'administration de Diclofénac (50mg/kg) provoque un puissant effet inhibiteur de l'inflammation durant toutes les phases, avec une inhibition maximale de  $76,92 \pm 0,8$  % à la 6ème heure (figure 14). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Ananthi et al. (2010)**. L'effet tardive du Diclofénac sur la formation de l'œdème est en relation directe avec son mode d'action. Le Diclofénac, utilisé comme médicament de référence est un anti-inflammatoire non stéroïdien, il réduit l'inflammation, en inhibant la synthèse des prostaglandines, et ce par l'inhibition de la COX pendant la phase tardive de l'induction à la carragénine (**Hassimotto et al., 2013**).

L'extrait phénolique de *P. halepensis* a montré une activité anti-inflammatoire durant toutes les phases du processus inflammatoire, probablement en utilisant plusieurs mécanismes d'actions. En outre, cet extrait a présenté une capacité antioxydante importante, suggérant que l'inhibition de la production des radicaux libres constitue l'un des mécanismes de l'activité anti-inflammatoire de cette plante. Plusieurs travaux de recherche menés sur l'étude du processus inflammatoire ont indiqué une libération de radicaux libres par les neutrophiles et les macrophages (**Beaudeau et Durand, 2008 ; GerhandVogel, 2008**). La richesse de l'extrait de la résine en composés phénolique

pourrait aussi contribuer à l'effet anti-inflammatoire. D'après **Kim et al. (2004)**, les flavonoïdes et les acides phénoliques contenus dans un végétal possèderaient des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*. Divers mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer cet effet expérimentalement, y compris l'inhibition de la production du NO, la phospholipase A2, la COX et la LOX.

### III.3.3. Evaluation de l'activité analgésique

Dans la présente étude nous avons tenté d'évaluer l'activité anti-nociceptive de l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* en utilisant des méthodes de nociception chimique et thermique, afin de définir les mécanismes d'analgésie ; le central et le périphérique.

#### III.3.3.1. Activité analgésique périphérique « Test de contorsions »

Le test de l'acide acétique est largement utilisé pour évaluer l'activité analgésique des extraits de plantes médicinales (Haider et al., 2011). En effet, l'injection intrapéritonéale de cet acide chez la souris provoque un syndrome douloureux qui se traduit par des contorsions caractéristiques de type de mouvement d'étirement des pattes arrières et de la musculature dorso-ventrale qui sont fortement liée à la sensibilisation des récepteurs nociceptifs qui vont induire la synthèse des prostaglandines, sérotonine et histamine (Frederico et al., 2009 ; Wantana et al., 2009 ). Les résultats de l'expérience ont été résumés dans le tableau suivant.

**Tableau VI :** Effet analgésique de l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* à 200 mg/kg et l'acide acétylsalicylique suite au test de torsion induit par l'acide acétique.

Groupes	Nombre de torsions	% d'inhibition
Contrôle (NaCl 0,9%)	70,83 ± 1,47	-
Extrait phénolique (200 mg/kg)	49,33 ± 1,36 ***	30,34± 1,93 ***
ASA (100 mg/kg)	34,5 ± 1,51 ***	51,28± 2,41

-Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM pour n= 6.

- \*\*\* p< 0,001, \*\* p< 0,01, \* p< 0,05, par rapport au groupe contrôle (test de Dunnet).

Au regard des résultats de l'évaluation de l'activité analgésique (tableau VI), il a été constaté que les souris du groupe contrôle ont développées un nombre important de crampes et de torsions abdominales de l'ordre 70,83 ± 1,47. Ce qui prouve bien que l'acide acétique à induit une réaction antalgique se traduisant par un étirement des pattes postérieures et une contraction des muscles dorso-abdominale. Chez le groupe traité par l'extrait phénolique de la résine à 200 mg/kg de *P. halepensis* ; il a été constaté une réduction très significative (p<0,001) du nombre de contractions abdominales induite par l'acide acétique 49,33 ± 1,36, ce qui donne un pourcentage d'inhibition de 30,34%. Cet effet est inférieur à celui exhibé par l'acide acétylsalicylique à 100 mg/kg 34,5 ± 1,51, équivalent à un pourcentage d'inhibition de 51,28%. Les mêmes constatations ont été

révélee par **Ahmed et al. (2003)** concernant l'efficacité des médicaments de référence par rapport aux extraits de plante.

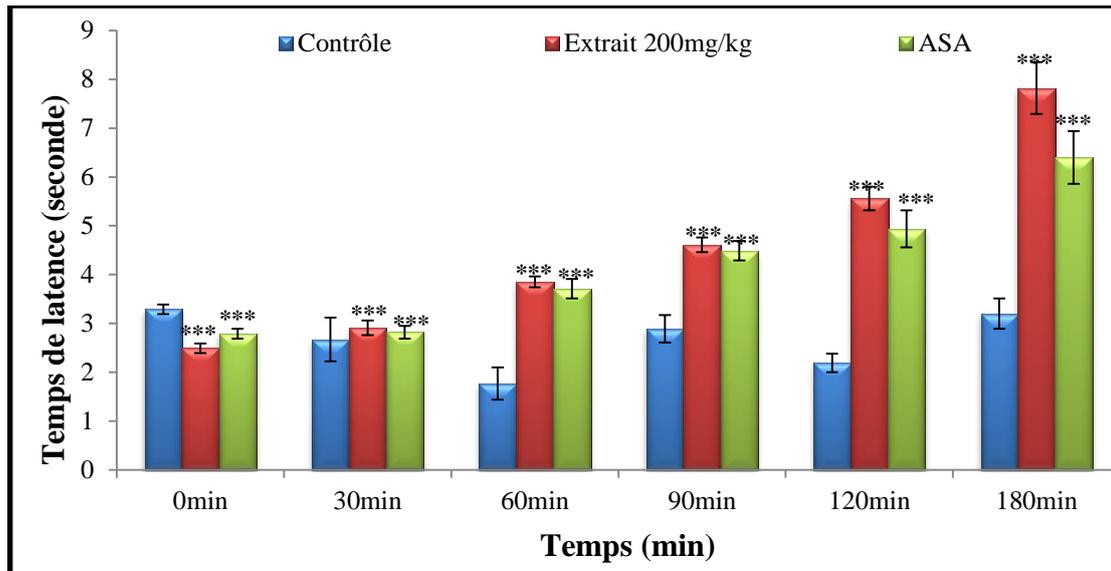
L'aspirine ou l'acide acétylsalicylique est un puissant agent vasoconstricteur et agrégeant plaquettaires, analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire, capable d'inhiber la synthèse des prostaglandines par inhibition des cyclooxygénases dans les tissus périphériques (**Vergne et al., 2000**).

La présente étude a révélé la richesse de la résine de *P. halepensis* en flavonoïdes. Ces composés exercent une activité analgésique en inhibant la synthèse des prostaglandines (**Shakeri et al., 2012**). De même, **Ahmed et al. (2010)**, ont attribué l'effet analgésique des extraits de plantes à la richesse de ces extraits en flavonoïdes, en acides phénoliques et en triperpenoïdes et qui sont doués d'une forte capacité inhibitrice de la COX et de la LOX.

### **III.3.3.2. Activité analgésique centrale « Test de l'immersion de la queue »**

Le test de l'immersion de la queue est utilisé pour la recherche de l'action analgésique centrale, de type morphine, qui consiste à tremper la queue de la souris dans de l'eau chaude à 55°C. L'immersion de la queue de l'animal dans l'eau chaude provoque un mouvement brusque de la queue et parfois le recul global du corps de l'animal. On mesure le temps de l'apparition de ce reflexe. Les résultats de ce test sont illustrés sur la figure 15.

Suite à une stimulation thermique, on remarque une augmentation très significative ( $p < 0,001$ ) du temps de latence des souris qui ont été traitées par l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* (figure 15). Cet effet débute pendant les premières 30 minutes et persiste jusqu'à la fin de l'expérience. La meilleure activité a été enregistrée à 180min de son administration avec un allongement du temps latence de  $2,49 \pm 0,11$ s à  $7,82 \pm 0,53$  s, ce qui donne un pourcentage d'inhibition de 68,15 %. Cet effet est très significativement ( $p < 0,001$ ) important que celui exercé par l'acide acétylsalicylique ( $6,40 \pm 0,54$ s) avec un pourcentage d'inhibition de 56,41% après 180 min, indiquant que l'extrait possède une bonne activité analgésique centrale.



**Figure 15:** Effet analgésique de l'extrait phénolique de la résine de *P. halepensis* à 200 mg/kg et l'acide acétylsalicylique suite au test de l'immersion de queue.

-Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM pour n= 6.

- \*\*\* p< 0,001, \*\* p< 0,01, \* p< 0,05, par rapport au groupe contrôle (test de Dunnet).

La morphine appartient à la classe des AINS, agit en réduisant la synthèse des prostaglandines via l'inhibition de la cyclooxygénase centrale et peuvent se lier aux récepteurs opioïdes spécifiques dans le système nerveux central, exerçant à la fois leurs activités analgésiques périphérique et centrale (**Ghosh et Firdous, 2004**).

La richesse de l'extrait de la résine de *P. halepensis* en polyphénols pourrait être à l'origine de sa capacité antioxydante, anti-inflammatoire et analgésique. **Saravanan et ses collaborateurs (2014)**, ont démontré que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tannins peuvent exhiber une activité antioxydante, analgésique et anti-inflammatoire, en même temps

## *Conclusion et perspectives*

## Conclusion et perspectives

Dans le but de mettre en évidence de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des maladies inflammatoires, nous nous sommes intéressés à la recherche de substances naturelles issues de la résine de *Pinus halepensis* employées traditionnellement par la population Algérienne.

La présente étude avait pour objectifs d'évaluer les activités biologiques de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis* à travers différentes méthodes *in vitro* et *in vivo*.

Au regard des résultats obtenus dans cette présente étude, il s'est avéré que la résine de cette plante étudiée, constitue une source importante en composés phénoliques dont les tannins, les acides phénoliques et les flavonoïdes.

La mesure du pouvoir antioxydant de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis* a révélé des activités antioxydantes très élevés, qui étaient supérieurs à 70% de l'activité étudiée.

L'expérimentation animale a été entreprise dans cette étude par évaluation des tests *in vivo* sur des souris, la recherche de la toxicité aiguë de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis* a montré que la DL50 est largement supérieure à 2000mg/kg, ce qui signifie que cet extrait est pratiquement non-toxique.

Les composés phénoliques de cette plante ont exhibé des activités anti-inflammatoires et analgésiques significatives. La richesse de l'extrait phénolique de la résine de *Pinus halepensis* en composés phénoliques pourrait être responsable de propriétés observées. Le potentiel antioxydant quant à lui peut participer à la lutte contre l'inflammation par piégeage des radicaux libres.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substance source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Il serait nécessaire d'approfondir ce travail par l'évaluation de l'activité antioxydant *in vitro* contre d'autres radicaux libres générés par des systèmes enzymatiques. L'isolement et l'identification des composés phénoliques par des méthodes plus performantes (HPLC) et la réalisation d'autres tests *in vivo* à d'autres doses.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

- **Ahmad, N.S., Waheed, A., Farman, M. and Qayyum, A. (2010).** Analgesic and anti-inflammatory effects of *Pistacia integerrima* extracts in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 129:250–253.
- **Alonso A. M., Guillen D. A. and Barroso, C.G. (2000).** Development of a new method for determining the antioxidant power of the phenolic compounds present in wines Mise au point d'une nouvelle méthode de calcul du pouvoir antioxydant des composés phénoliques présents dans le vin. *Office international de la vigne et du vin*. 73 : ( 837-38): 794-808.
- **Ananthi, S., Alaji, H.R., Sunil, A.G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G. and Vasanthi, H. R. (2010).** In vitro antioxydant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food Chemistry.Toxicol.* 48: 187-192.
- **Arslan, R., Bektas, N. and Ozturk, Y. (2015).** Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice. *Journal of Ethnopharmacol.* 131: 28-32.
- **Backonja, M. M., (2003).** Defining neurophatic pain. *Anesthetics analgesic.* 97: 785-790.
- **Bagad, A.S., Joseph, J.A., Bhaskaran, N. and Aarwa, A. (2013).** Comparative Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Curcuminoids, Turmerones, and Aqueous Extract of *Curcuma longa*. *Pharmacological Sciences*.1-7.
- **Balasundram, N., Uyttendaele M. and Debevere J. (2007).**Antioxidant proprieties of palm fruits extracts. *Asia Pac JClin Nutr.* 4(4): 319- 324
- **Beaudeau, J.L. and Durand, G. (2008).** Biochimie médicale, marqueurs actuels et perspectives. *La voisir, Médecine Sciences Publications* 1ère Edition, p: 101.

- **Bergonzi, M.C., Bilia, A.R., Gallori, S., Guerrini, D. and Vincieri, F.F.(2001).** Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Development and Industrial Pharmacy*.27: 491–497.
- **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.
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*. 28: 25-30.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation Lavoisier*. 3 : 286-347.
- **Bruneton, J. (2008).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation Lavoisier*. 199-339.
- **Cabrini, D.A., Henrique, H., Priscila, I., DaSilva,C., Pietrovski, E.F., Buenomendes, D.A.G., Da Silveira Prudente, A., Pizzolatti, M. G., Brighente, I.M.C. and Otuki, A.F. (2011).** Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *averrhoa carambola* l. In mice. *Evidence Based Complement Alternative Medecine. Epub*: 908059.
- **Ching, P.L., Jen, P.H., Chung-S, W., Chih, Y.H. and Chaw, S.M. (2010).** Comparative Chloroplast Genomics reveals the evolution of *Pinaceae* Genera and Subfamilies. *Genome Biology*. 2: 504–517.
- **Conforti, F., Sosa, S, Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F. and Della Loggia, R. (2008).** *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of mediterranean dietary plants. *Journal Ethnopharmacol*. 116: 144–151.

- **Cotelle, N., Benier, J. H., Catteau, J. P., Gaydoue, E. and Wallet, J. C. (1995).** Activité biologique de 24 flavones: inhibition de la xanthine oxydase et capture de radicaux libres. *Edition INRA*. P : 359-396.
- **Da Silva, S. L., Calgarotto, A. k., Chaar, J.s. and Marangoni, S (2008).** Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia Sylvestris* Sw aqueous extract with anti- PLA2 activity. *Toxicon*. 52: 655-666.
- **Dean, R.T., Shanlin, F.U., Stocker, R. and Davies, M.J. (1997).** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem Journal*. 324 :1-18.
- **Delarue, J. (2001).** Acides gras polyinsaturés à longue chaîne n-3 et inflammation, *Nutr Clin Metab* 15: 172–176.
- **Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. and Bekhradnia, A.R. (2008).** Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*.7 (18): 3188-3192.
- **Elmastase, M., Gulçin, I., Isildaka, O., Kufrevioglu, O.I., Ibaoglu, K. and Aboul- Eneinc H.Y. (2006).** Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 3:258-266.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p108-115.
- **Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr*. 64: 390-396
- **Frederico, A.V., Higor, F.L., Elson, A.C., et al. (2009).** Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L., Brazil. *Journal of Pharmaceut Science* 45: 437-442.

- **Gerhardvogel, H.(2008).**Drug Discovery and Evaluation :Pharmacological Assays. Edition Springer, p: 1094.
- **Geronikaki, A. A. and Gavalas, A.M. (2006).** Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 9: 425-442.
- **Ghanmi, M., Satrani, B., Chaouch, A., Aafi, A., Al Abid, A., Ismaili, M.R. and Farah, A. (2007).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*pinus halepensis*) du maroc. *Acta Botanic Gallica*. 154 (2) : 293-300.
- **Ghosh, S. and Firdous, S.M. (2014).** Evaluation of analgesic activity of hydroalcoholic extract of *Ipomoea staphylina*. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 38 (2):57–105.
- **Gomes, C., Lourenc, E.L.B., Liuti, E. B., Duque, A.O., Nihi, F., Lourenc, A.C., Mendes, T. C., Junior, A.G. and Dalsenter, P. R. (2012).** Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 142 : 481-487.
- **Gramza, A. and Korczak, J. (2005).** Tea constituents (*Camellia sinensis L*) as antioxidants in lipid systems. *Tends in Food Science and Technology*. 16: 351-358.
- **Grossenbacher, E. (2011).** Pinède de pin d'Alep. *Groupe d'étude floristique du jura et du jura bernois*.
- **Gulçin I., Alici H.A. and Cesur M. (2005).** Determination of in vitro Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulltein*.53 (3):281-285.

- **Haider, S., Nazreen, S., Alam, M.M., Gupta, A., Hamid, H. and Alam, M.S.(2011).** Antiinflammatory and anti-nociceptive activities of ethanolic extract and its various fractions from *Adiantum capillus veneris* Linn. *Ethnopharmacology*, 138:741–747.
  
- **Hassimotto, N.M.A., Moreira, V., Galvao do Nascimento, N., Maggio de Castro Souto, P.C., Teixeira, C. and Lajolo, F.M. (2013).** Inhibition of carrageenan-induced Acute Mulberry and Cyanidin-3-Glucoside. *Biological Medicine Research International*. 1-10.
  
- **Hmiril, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M. and El Ajjouri, M. (2011).** Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *mentha pulegium* et d'*eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*. 80 : 824- 836.
  
- **Ishola, I.O., Akindele, A.J. and Adeyenni, O.O. (2011).** Analgesic and anti-inflammatory activities of *Cnestis ferruginea* Vahk ex DC (Conmaraceae) methanolic root extract. *Ethnopharmacology*, 135:55-62.
  
- **Jayaprakasha, G.K., Girenavar, B. and Patil, B.S. (2008).** Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges : Extraction efficiency of solvents in sequence. *Food Science and Technology*. 41 :376-384.
  
- **Kadik, B. (1987).** Contribution à l'étude du pin d'Alep (*pinus halepensis* Mill) en Algérie : Ecologie, Dendrométrie, Morphologie. *Office des publications universitaires (Alger)*. P 585-587.
  
- **Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V. and Montero, J.L. (2014).** Antiangiogenic activity of neutral lipids , glycolipids , and phospholipids fraction of *pinus halepensis* Mill. *Seeds. Industrial Crops and products*. 54: 6-12.

- **Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H .J., Rauha , J.P., Pihlaja, K. and Kujala, T.S. (1999).** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- **Kim, S., Jun, C., Suk, K., Choi, B., Lim, B., Park, S., Lee, S. H., Shin, H., Kim, D. and Shin, T. (2006).** Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci.* 91 (1) : 123-131.
- **Koechlin-Ramonatxo,C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutritionclinique et métabolisme.* 20 (4): 165–177.
- **Kresec, O., Richard, J., Brusserolles, J., Guastella, V. and Eschalièr, A. (2007).** composante centrale de l'effet antalgique des AINS. *Douleur et analgésie* 20:1-9.
- **Langenheim, J.H. (2003).** Plant resins - *Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany.* Edition p. 24-24
- **Lantto, T.A., Dorman, H.J.D., Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Tikhonov, V.P., Hiltunen, R. and Raasmaja, A. (2009).** Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food chemistry.* 112 :936-943.
- **Lapointe, G. (2004).** Notions de toxicologie. 2ème édition. Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec. P : 39.
- **Lim, Y. Y. and Murtijaya, J. (2007).** Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT*, 40: 1664-1669.
- **Lüllmann, H., Mohr, K. and Ziegler, A. (2001).** Atlas de poche de pharmacologie. Edition Médecine-Science Flammarison (2ème édition), p:192-200.

- **Maksimovié, Z., Maleni, D. and Kovacevié, N. (2005).** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*. 96 (8): 873 - 877.
- **Marc, F., Brisbarre, F., Davin, A., Baccaunaud, M. and Ferrand, C. (2004).** Évaluation du pouvoir antioxydant (TEAC) d'extraits de végétaux en vue d'utilisations alimentaires. *An international journal of food science and technology*. 24(5):399-414.
- **Martin, S. and Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 : 304-315.
- **Medzhitov, R. (2008).** Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454: 428-435.
- **Modugno, F., Ribechini, E. and Colombini, M.P. (2006).** Aromatic resin characterisation by gas chromatography-mass spectrometry: Raw and archaeological materials. *Journal of Chromatography* .85: 164-173.
- **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal. Science and Technology*. 26(2) : 211-219.
- **Morandat, S. and El Kirat, K. (2013).** Les antioxydants et les membranes lipidiques : effet sur la peroxydation, localisation de la fraction antioxydante et quantification de l'interaction. *Colloque Cosmétopée*. P : 03.
- **Motte-Florac, E (2000).** Les utilisations médicinales de la résine de Pin dans le centre du Mexique: la disparition d'un savoir, *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*. 147(3) : 303-304.
- **Mueller-Harvey, I. (2001).** Analysis of Hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 3-21.

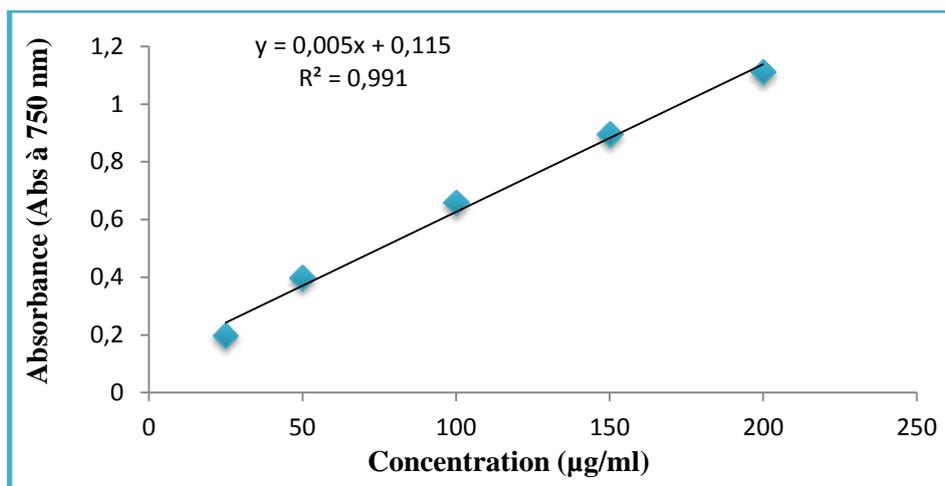
- **Naczk, M. and Shahidi, F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1523-1542.
- **Nahal, I. (1962).** Le pin d'Alep. Etude taxonomique, phytographique, écologique et sylvicole. *Annales de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts*. 19 (4), 533-627.
- **Nathan, C. (2002).** Points of control in inflammation. *Nature*. 420: 846-852.
- **Ojewole, J.A.O. (2003).** Evaluation of the anti-inflammatory properties of *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. (family: Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats. *Ethnopharmacology*, 85:217-220.
- **Onasanwo, S.A., Fabiyi, T.D., Oluwole, F.S. and Olaleye, S.B. (2012).** Analgesic and anti-inflammatory properties of the leaf extracts of *Anacardium occidentale* in the laboratory rodents Niger. *Journal of Physiological Sciences*. 27:65– 71.
- **Ozenda, P. (2006).** Les végétaux. Organisation et diversité biologique. 2<sup>ème</sup> édition. Dunod. Paris. P : 516.
- **Penn, N.W. (1995).** Potentiation of morphine analgesic action in mice by beta-carotene. *European Journal of Pharmacology*. 284: 191–193.
- **Ravelo-Calzado, Y., Molina-Cuevas, V., Jiménez-Despaine, S., Pérez-Guerra, Y., Oyarzábal-Yera, A., Carbajal-Quintana, D. and Mas-Ferreiro, R. (2011).** Effects of D-002 on xylene-induced oedema in ear of mice Revista CENIC. *Ciencias Biológicas*. 42 (1) : 13-16.
- **Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M. and Aggarwal, B.B., (2010).** Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biology. Med.* 49:1603–1616.

- **Romani, A., Pinelli,P., Cantini, C., Cimato, A. and Heimler, D. (2006).** Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L. *Food Chemistry* 95: 221–225.
- **Russo-Marie, F., Peltier, A. and Polla, B. (1998).** L'Inflammation. John Libbey Eurotext, Paris. p.565.
- **Saravanan, S., Arunachalam, K. and Parimelazhagan, T. (2014).** Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves a promising species of passiflora. *Industrial. Crops. Product.* 54: 272-280.
- **Shakeri, F., Rostamian, V. and Estakhr, J. (2012).** Analgesic Properties of Methanolic Extract of *Matricaria recutita* in Rats in both Acute and Chronic Pains. *Asian Journal of Medical Sciences.* 4(4):152–155.
- **Sharififar, F., Khazaeli, P., Alli, N., Talebian, E., Zarehshahi, R. and Amiri, S. (2012).** Study of antinociceptive and anti-inflammatory activities of certain Iranian medicinal plants. *Journal. Intercul. Ethnopharmacol.* 1 (1): 19-24.
- **Stein, C., Schafer, M. and Hassan, A.H. (1995).** Peripheral opioid receptors. *Annals of medicine* 27:219-221.
- **Swain, T. and Hillis, E. (1959).** The phenolic constituents of *prunus domestica*. *Journal of the science and food chemistry* 10: 63-68.
- **Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M. and Sokmen, A. (2005).** Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering.*66:447–454.

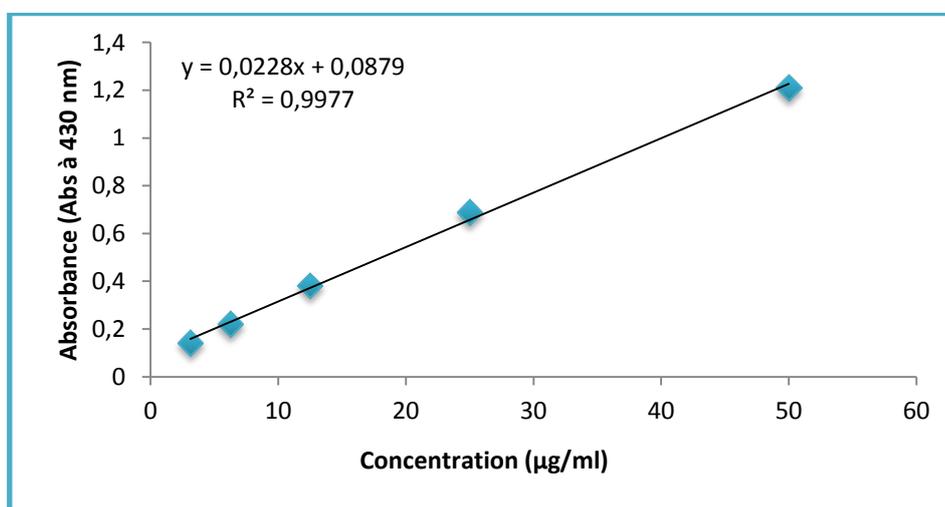
- **Vergne, P., Bertin, P. and Trèves, R. (2000).** Aspirine, douleurs et inflammation. *Revue de Médecine Interne*. 21(1) :89–96.
  
- **Viau, C. and Tardif, R. (2003).** Toxicologie. *Environnement et santé publique – fondement et pratique*. 143 : 120-123.
  
- **Wang, S.Y. and Zheng, W. (2001).** Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in Strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4977–4982.
  
- **Wantana, R., Tassanee, N. and Subhadhirasakul, S. (2009).** Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals. *Journal of Natural Med* 63: 290–6.
  
- **Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W. (1962).** Carrageenan-induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 111:544–7.
  
- **Yildirim, A., Oktay, M. and Bialaloglu, V. (2001).** The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turkish of Medical Science*. 31: 23-27.
  
- **Zanini Jr, J.C., Medeiros, y.S., Cruz, A.B., Yunes,R.R.A. and Calixto, J.B . (1992).** Action of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear oedema in mice. A comparative study with steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Phytotherapy Research*. 6(1): 1 5.
  
- **Zhu, Z.Z., Ma, K.J., Ran, X., Zhang, H., Zheng, C.J., Han, T., Zhang, Q.Y. and Qin, L.P. (2011).** Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. *Ethnopharmacology*, 133:1126-1131.
  
- **Anonyme:**[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8b/Icone\\_botanique01.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8b/Icone_botanique01.png)



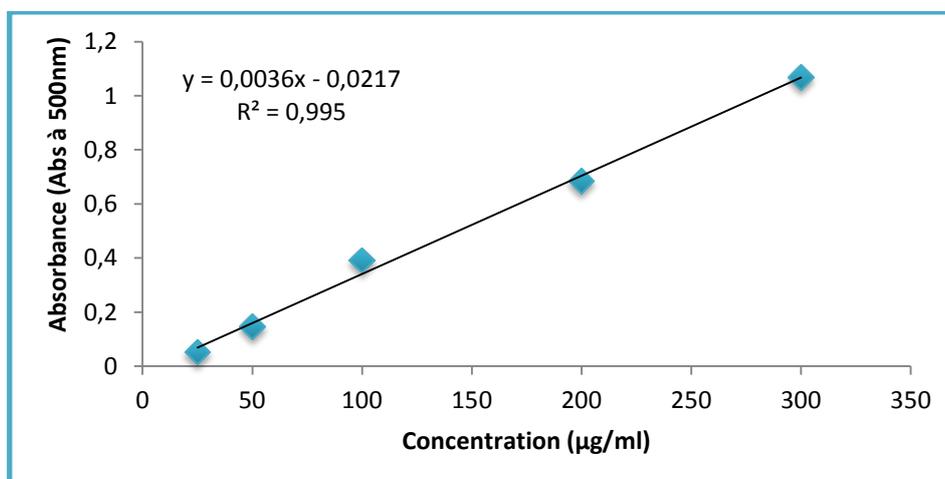
# *Annexes*



**Annexe n°1 :** Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.



**Annexe n°2 :** Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.



**Annexe n°3 :** Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des tannins condensés.

## Résumé

*Pinus halepensis* Mill est une plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Le but de la présente étude était de caractériser les activités biologiques *in vivo* et *in vitro* de l'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis*. Le criblage préliminaire basé sur des tests spécifiques a démontré la présence de principaux groupes chimiques ayant de grandes valeurs thérapeutiques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins). Le test de pouvoir réducteur et du DPPH sont utilisés pour évaluer l'effet antioxydant de l'extrait phénolique de la résine, les résultats ont démontré que ce dernier possède une activité réductrice importante et une forte activité scavenger contre le radical DPPH. Par ailleurs, L'expérimentation animale a été entreprise dans cette étude par évaluation des tests *in vivo* sur des souris. L'étude de la toxicité aiguë a montré que cet extrait n'exerce aucun effet toxique (DL50>2g/kg). L'activité anti-inflammatoire testée par deux modèles d'inflammation aiguë et l'activité analgésique testée par des méthodes de nociception chimique et thermique, ont révélé que l'extrait phénolique de la résine de *P.halepensis* a exhibé des activités anti-inflammatoires et analgésiques significatives.

**Mots-clés :** *Pinus halepensis*, résine, antioxydant, anti-inflammatoire, analgésique.

---

## Abstract

*Pinus halepensis* Mill is a commonly used plant in traditional medicine to treat various diseases. The purpose of this study was the characterization of the biological activities *in vivo* and *in vitro* of the resin phenolic extract of *P.halepensis*. Preliminary screening demonstrated the presence of major chemical groups (total polyphenols, flavonoids and tannins). Reductive potency and DPPH were used to evaluate the antioxidant effect of resin phenolic extract, the results demonstrated that this extract has a significant reducing activity and a strong scavenger activity against the DPPH radical. In addition, animal experiments were evaluated in mice. The study of acute toxicity showed that the resin phenolic extract has not toxic effect (LD50> 2g / kg). The anti-inflammatory activity tested by two models and the analgesic activity tested by chemical and thermal nociception methods, revealed that the resin phenolic extract of the *P.halepensis* exhibited significant anti-inflammatory and analgesics activities.

**Keywords:** *Pinus halepensis*, resin, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic.

---

## ملخص

الصنوبر الحلبي نبات يستخدم عادة في الطب التقليدي لمعالجة الامراض المختلفة في الجزائر. الغرض من هذه الدراسة هو تحديد الخصائص البيولوجية لراتنج الصنوبر باستخدام فحوصات مخبرية، و تجارب عن الحيوانات المخبرية. اظهر الفحص الاولي ان الراتنج يحتوي على مجموعة من المركبات الفينولية التي تتمثل في (Phénols totaux, flavonoïdes, tannins). تم اختبار القدرة المضادة للأكسدة و الارجاع للمستخلص الفينولي للراتنج باستخدام فحوصات DPPH و قدرة الارجاع. و علاوة على ذلك تم اجراء التجارب على الحيوانات من اجل تقييم القدرة المضادة للالتهاب، و المسكنة للالام لهذا المستخلص، و التي اثبتت انها تملك قدرة عالية ضد الالتهاب و في تسكين الالام. بينما اثبتت دراسة السمية الحادة انه لا يملك اي تأثير سلبي على الفئران (DL50 < 2مغ / كغ). في الختام تبرر هذه الدراسة استخدام الصنوبر في الطب التقليدي.

**الكلمات الرئيسية :** الصنوبر الحلبي، الراتنج، مضاد الاكسدة، مضاد الالتهاب، مسكن الالام.