

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2019

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

RAHMANI Hasna Soumia & ZEMOUR Wissam

Thème

*Effets pharmacologiques des extraits bruts des graines de
Pinus halepensis Mill*

Soutenu le : 07 / 07 / 2019

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. REMINI Hocine</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M^{me}. BELKADI Asma</i>	<i>DOCTEUR</i>	<i>CRD-Saidal. Alger</i>	<i>Co-Promoteur</i>
<i>M. CHERGUI Achour</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>
<i>M^{me}. HALI Latifa</i>	<i>DOCTEUR</i>	<i>CRD-Saidal. Alger</i>	<i>Invitée</i>

Année Universitaire : 2018/2019

« Ça a toujours l'air impossible

Jusqu'à ce qu'on le fasse. »

Nelson Mandela

Remerciements

Louange à ALLAH, nous le glorifions, lui demandons aide et invoquons son pardon contre le mal de nos péchés, celui qui fut guidé, personne ne peut l'égarer et celui qui est égaré, personne ne peut le guider. nous témoignons qu'il n'y a point de divinité digne d'adoration sauf ALLAH, l'Unique, qui n'a point d'associé.

Ce travail a été réalisé au niveau de la société SAIDAL Alger, Animalerie du laboratoire « pharmaco-toxicologie » sous la direction de Mr KADRI et Madame BELKADI Asma.

Tout d'abord, nous tenons à remercier du fond du cœur, notre promoteur le docteur KADRI Nabil que nous estimons énormément. Nous avons beaucoup apprécié ses qualités d'enseignant et d'encadrement. Nous aimerons lui adresser nos plus vifs remerciements pour l'attention qu'il a porté à ce travail pour la confiance qu'il nous a toujours témoigné, son soutien, ses conseils, sa gentillesse, sa disponibilité et sa rigueur dans le travail qui est un des éléments majeurs du bon déroulement de ce travail.

Nous sommes également sensibles à l'honneur que nous fait madame BELKADI Asma en acceptant d'être la Co-promotrice de ce travail. Nous tenons à lui exprimer nos profondes reconnaissances, elle nous a permis de réaliser ce mémoire dans les meilleures conditions.

Comme nous sommes très reconnaissantes à toute l'équipe de l'animalerie pour leurs conseils et leur aide dans la réalisation de la partie in vivo, en particulier DAHMANE Moussa et Tahar.

Nos vifs remerciements vont à l'égard des membres de jury en l'occurrence Mr REMINI qui nous a fait l'honneur de présider ce jury et Mr CHERGUI qui a accepté d'apporter sa contribution en examinant notre travail.

Nous adressons, enfin et surtout, nos plus profondes gratitude et tout notre amour à nos familles qui ont su nous faire confiance et nous soutenir en toutes circonstances, ainsi qu'à tous nos proches amis

Merci

à ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

DEDICACES

Je dédie cet événement marquant de ma vie :

*A mon idole, la personne la plus précieuse dans ce monde pour moi, ma chère maman « **Achit Fadhila** » qui a toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait, qui ma soutenu et encouragé tout au long de mon parcours, qui a éclairci mon chemin et qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour tous les sacrifices dont tu as fait preuve à mon égard, patience et soucie de tendresse et d'affection, sans toi ma réussite n'aura pas eu lieu, je consacrerai le reste de mon existence à faire de mon mieux pour te rendre la plus heureuse de toutes les créatures. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donne santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

*A l'homme qu'autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude suffisamment car tout simplement tu es unique, mon merveilleux cher père « **Rahmani Abd Allah** », tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que tu n'as cessé de formuler dans tes prières. Que Dieu te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.*

*A mes frères, « **Adnane** » et « **Hichem** » qui m'ont toujours donné la force de continuer. Je vous confirme mon attachement et mon amour, puisse dieu vous protège et vous garde pour moi.*

*A la femme de mon frère « **Hayet** », qui a beaucoup de valeur à mes yeux.*

*A ma famille, mes proches en particulier mon oncle « **Taher** » et sa femme « **Ryma** » qui me sont très chers, merci de m'avoir accueilli chez vous. Mon oncle **Kader** qui m'a toujours remonté le moral.*

*Mes petits cousins « **Nour** » et « **Jawed** » pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré.*

*A mes chers amis **Souhila, Imane, Dia, Manel, Lamia, Lilia, Tiziri, Maria, Meriem, Ilham, Latifa, Ines, Selma, Amina, Réza, Nazeh, Islem...** qui ont toujours été là pour moi et surtout m'entouré avec leur chaleureuse énergie. Je vous souhaite plus de succès.*

*Un remerciement spécial pour « **Benzitoune Imane** » qui m'a vraiment aidé à accomplir ce travail.*

*A mon binôme « **Wissam** », avec qui j'ai partagé ce modeste travail et qui n'a pas toujours été facile, on a partagé tellement de choses.*

Je tiens à remercier vivement tous ce qui, de près ou de loin ont participer dans ce projet.

Hasna

DEDICACES

Je dédie ce mémoire

*A ma très chère mère « **ALILI Noria** »*

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçois ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

*A mon très cher père « **ZEMOUR Youcef** »*

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

*A la mémoire de ma grand-mère maternelle **MOUSSI Ounissa** qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je te dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, t'accueille dans son éternel paradis.*

*A mes très chers frères **Nacim** et **Lamine***

*Pour leurs encouragements et je leurs souhaite tout le bonheur et la réussite.
En témoignage de leur amour et de leur affectation dont ils ont toujours fait preuve.*

Merci de m'avoir soutenu J'ai toujours pu compter sur vous. Puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

*A toute ma famille pour leur soutien cette année, spécifiquement mon oncle **Lyes**, sa femme **Angélique** et mes cousins **Zaki** et **Jawad**.*

*A mon binôme **Hasna** avec qui j'ai réalisé ce travail en partageant les moments de joie, fatigue, stress et pression.*

*A **Imane** merci pour nous avoir aidé tout au long de ce travail*

*A mes très chères copines et sœurs « **Anna**, **Asma** et **Mouna** » je vous adore.*

Wissam

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AIS : Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens.

AP-1 : Protéine activatrice-1.

COX-2 : Cyclo-oxygénase inductible.

GC : Glucocorticoïdes.

IAM : Indice de l'activité de la maladie.

IL : Interleukine.

Inos : Oxyde nitrique synthase inductible.

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

mg EAG/g : Milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme.

mg Eq Q/g : Milligrammes équivalent de quercétine par gramme.

NF-Kb : Nuclear factor-kappa B.

NOD2 : Nucleotide-binding oligomerization domain 2.

RCH : Rectocolite hémorragique.

TLR : Toll-like receptors.

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha.

PGE2 : Prostaglandine E2.

PGI2 : Prostaglandine I2.

PGD2 : Prostaglandine D2.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographies de l'arbre de <i>Pinus halepensis</i> (a), des cônes (b), des aiguilles (c), des graines (d)	3
Figure 2 : Structure du noyau phénol.....	6
Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes.....	7
Figure 4 : Classification des polyphénols	8
Figure 5 : Effets biologiques des polyphénols	9
Figure 6 : La réaction inflammatoire schématisée	11
Figure 7 : L'inflammation aiguë.....	12
Figure 8 : Protocole expérimentale de l'activité anti-inflammatoire (méthode de pied à coulisse).	22
Figure 9 : Protocole expérimentale de l'activité anti-inflammatoire (méthode de couper les pattes).	23
Figure 10 : Protocole expérimentale de l'activité recto-colite.....	28
Figure 11 : Déshydratation, éclaircissement et imprégnation des cassettes.	29
Figure 12 : Réalisation de coupe fine à l'aide d'un microtome.....	30
Figure 13 : Bain chaud (A), platine chauffante (B).	30
Figure 14 : les différentes étapes de déparaffinage à l'éclaircissement.....	31
Figure 15 : L'aspect macroscopique du colon chez les souris. A : témoin, B : acide acétique, C : référence, D : essai.....	40
Figure 16 : Evaluation du poids et observation des souris de chaque lot en fonction des jours.....	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Taxonomie de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	4
Tableau II : Rôle des polyphénols	8
Tableau III : Différents leucocytes intervenant au cours de la réponse inflammatoire.....	13
Tableau IV : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire	14
Tableau V : Les différents traitements appliqués.	20
Tableau VI : Les différents traitements appliqués.....	24
Tableau VII : Les différents scores cliniques	25
Tableau VIII : Scores macroscopiques.....	25
Tableau IX : Poids d'extraits secs et rendement correspondant des deux extraits des composés phénoliques à partir des graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	32
Tableau X : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/ gE) et en flavonoïdes (mg EQ/ gE) des différents extraits.	33
Tableau XI : Effet de l'extrait aqueux graines <i>Pinus halepensis</i> et l'Ibuprofène sur l'œdème induit par la carragénine.....	34
Tableau XII : Effet de l'extrait éthanolique des graines <i>Pinus halepensis</i> et l'Ibuprofène sur l'œdème induit par la carragénine.....	35
Tableau XIII : Effet de l'extrait aqueux graines <i>pinus halepensis</i> et l'Ibuprofène sur l'œdème de la patte induit par la carragénine.	37
Tableau XIV : Evaluation quotidienne de l'évolution de l'inflammation selon les scores cliniques.	44
Tableau XV : Observation des microphotographies de la section histologique du fragment du côlon des souris des différents lots colorée avec Hématoxyline / Eosine.....	48
Tableau XVI : Observation des microphotographies de la section histologique du fragment du côlon des souris du lot essai atteint de la rectocolite induite par l'acide acétique, colorée avec Hématoxyline/Eosine.....	49

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
--------------------	----------

Pin d'Alep et infalammation

I. <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	3
I.1. Description botanique	3
I.2. Taxonomie.....	4
I.3. Composition chimique	4
II. Métabolites secondaires des végétaux.....	5
II.1. Les saponines	5
II.2. Les alcaloïdes.....	5
II.3. les terpénoïdes et les stéroïdes	5
II.4. Les polyphénols	6
II.4.1. Classification.....	6
II.4.2. Effets biologiques des polyphénols.....	8
II.4.3. Polyphénols et inflammation.....	9
III. Inflammation	10
III.1. Inflammation aiguë.....	12
III.2. Inflammation chronique	12
III.3. Cellules impliquées dans l'inflammation	13
III.4. Médiateurs de l'inflammation	14
III. 5. Anti-inflammatoires.....	15
III.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	15
III.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes).....	15

III.5.3. Anti-inflammatoires naturels	15
---	----

Materiel et méthodes

I.Matériel.....	16
I.1. Materiel animal	16
I.2. Materiel végétal.....	16
I.3.Réactifs.....	16
II. Méthodes	16
II.1. Extraction et préparation des extraits.....	16
II.2. Préparation de la poudre délipidée.....	17
II.2.1. Préparation de l'extrait aqueux	17
II.2.2. Préparation de l'extrait éthanolique	17
III. Evaluation des taux des composés phénoliques.....	17
III.1. Dosage des polyphénols totaux	17
III.2. Dosage des flavonoïdes	18
IV.Activité anti-inflammatoire.....	19
IV.1. Méthode de pied à coulisse	19
IV.2. Méthode de couper les pattes	22
V.Evaluation de l'activité intestinale rectocolite	24

Resultats et discussion

I. Rendement d'extraction.....	32
II. Taux en phénols totaux et flavonoïdes	33
II.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	34
II.1. Méthode de pieds à coulisse	34
II.1.1. Extrait aqueux	34
II.1.2. Extrait éthanolique	35
II.2. Méthode de couper les pattes	36
III. Evaluation de l'activité intestinale recto-colite.....	39

III.1. Observation macroscopique	40
III.2. Observation microscopique	47

Conclusion générale et perspectives.....	51
---	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale

Introduction

L'inflammation est un processus physiologique de défense et d'adaptation de l'organisme contre toute agression qui entraîne une altération tissulaire. Elle peut être déclenchée par une brûlure, un traumatisme, une irradiation ou par la pénétration d'agents pathogènes extérieurs (virus, bactéries, antigènes, ...) (**Schorderet, 1992**). Le plus souvent, cette réaction est bénéfique pour l'hôte agressé. Cette réaction met en jeu de nombreux systèmes biologiques qui visent à détruire ou à éliminer la substance étrangère.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étiopathologie de la réaction inflammatoire (**Perrin et al, 1987**). C'est dans ce sens que l'étude de l'activité anti-inflammatoire des plantes est aujourd'hui devenue importante, car on peut retrouver dans les végétaux de puissants anti-inflammatoires.

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**). Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et que les traitements à base de ces dernières reviennent au premier lieu car l'efficacité des médicaments décroît vue leurs effets secondaires sur la santé publique. Plusieurs études épidémiologiques et travaux expérimentaux ont établi que l'alimentation méditerranéenne traditionnelle est la meilleure alternative pour une meilleure santé (**keys, 1995**). Dans ce contexte, le recours aux ressources naturelles et plus particulièrement aux plantes médicinales devient une importante voie alternative à explorer (**Chebaibi et al, 2011**).

Parmi les plantes qui n'ont pas vraiment fait l'objet d'études, on trouve les graines de pinus. Les pins sont les espèces d'arbres les plus communément plantées à cause de leur croissance rapide, de leur résistance aux conditions les plus xériques, de leur aptitudes à reconstituer les zones dégradées et à occuper les terrains nus (**Zavala and Zea, 2004**). Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est l'une des essences les plus répandues dans la région méditerranéenne (**Quezel and Barbero, 1992**).

La plupart des pins sont considérés comme une source importante de composés bioactifs structurellement divers et ont contribué à la découverte d'agents pharmaceutiques et d'autres applications biomédicales (**Šarac et al, 2014**). Les données expérimentales

relatives aux propriétés bénéfiques des espèces de *Pinus* concernent principalement leurs activités anti-inflammatoires (**Rhodewald, 2002**).

La présente étude a pour objectif de donner des bases scientifiques à l'utilisation de cette plante méditerranéenne peu exploitée. Au cours de cette étude, les activités anti-inflammatoires et anti rectocolite., issues des graines de *P. halepensis* Mill ont été évaluées sur des modèles animaux. Le criblage phyto-chimique a été mené afin de caractériser les principaux groupes chimiques bioactifs susceptibles de conférer à la plante les activités décrites.

Pour cela, notre étude englobe deux parties, dont :

- La première est une synthèse bibliographique de quelques rappels sur la systématique de la plante (*Pinus halepensis* Mill) et ses propriétés. Une partie sur l'inflammation a été aussi développée dans cette partie
- La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale, qui porte sur l'extraction des polyphénols et leurs dosages ainsi que l'étude de leurs activités anti-inflammatoires.

Synthèse bibliographique

I. *Pinus halepensis* Mill.

I.1. Description botanique

C'est une espèce appartenant à la famille des Pineaceae, ce sont des arbres conifères de 2 à 100 m de haut, leurs feuilles sont des aiguilles vertes, piquantes ou non, plus ou moins longues, attachées seules aux rameaux, ou réunies par deux ou en rosettes (Feikh, 2014). Il est naturellement réparti dans la région méditerranéenne où il couvre plus de 25 000 km² et domine les formations forestières dans les régions semi-arides et arides. Il envahit également certaines zones de l'hémisphère sud. *Pinus halepensis* Mill a été largement planté dans le bassin méditerranéen occidental au cours de ce siècle, mais en Afrique du Nord, il prédomine, notamment en Algérie et Tunisie (Maestrea et al, 2003; Nahal, 1962).

Cette espèce est souvent utilisée en cosmétique pour ses épines, riche en huiles essentielles aromatiques. Cependant, les huiles des graines de pin sont une source non négligeable de composés phénoliques et d'huiles essentielles qui sont de très bons agents thérapeutiques qui pourraient être orientés vers l'utilisation de ces graines en pharmacie et industries cosmétiques (Kadri et al, 2015) et elles sont également utilisés en médecine traditionnelle et dans de nombreuses cuisines où ils ornent les pains traditionnels, les salades, le riz et le poisson (Nasri et al, 2005).

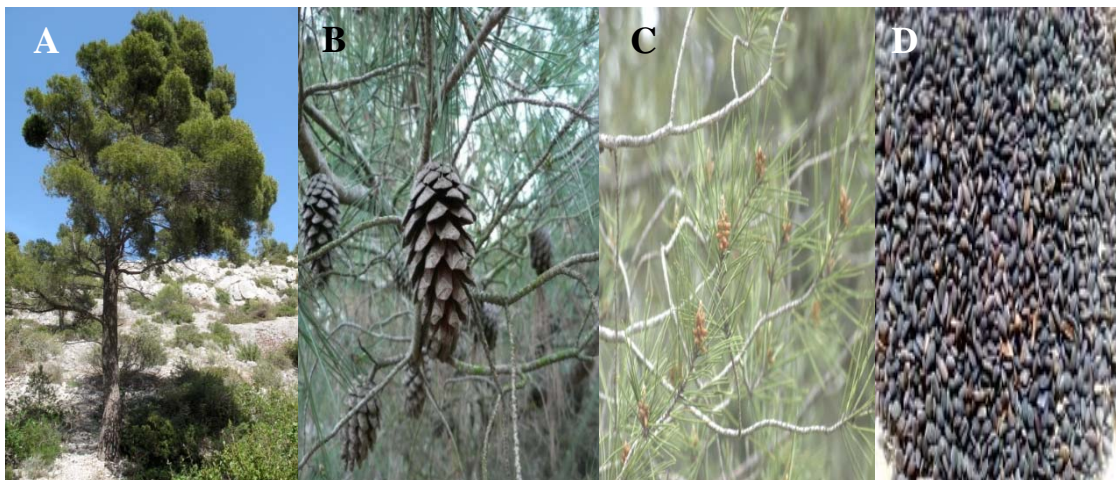


Figure 1 : photographies de l'arbre de *Pinus halepensis* (a), des cônes (b), des aiguilles (c), des graines (d) (Feikh, 2014).

I.2. Taxonomie

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

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

Taxonomie	Description
Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphyta
Sous-embranchement	Gymnospermae
Classe	Pinopsida
Ordre	Abietales
Famille	Pinaceae (Abietaceae)
Sous-famille	Pinoïdeae
Genre	<i>Pinus</i>
Sous-genre	Eupinus
Espèce	<i>Pinus halepensis</i> Mill

I.3. Composition chimique

L'analyse moyenne des graines a montré la composition suivante (en pourcentage du poids sec) : protéines 22,7% ; huile 43,3% ; cendres 8,3% et les hydrates de carbone totaux 25,7%, polyphénols totaux 3,71 et les flavonoïdes 0,80. Le potassium, magnésium et calcium étaient les minéraux dominants présents dans les graines et atteignent ensemble les 1%. Les acides oléiques et linoléiques étaient les acides gras insaturés principaux (27,3 et 48,8% ; respectivement), alors que le principal acide gras saturé était l'acide palmitique (8,75%) (Cheikh-Rouhou et al, 2006).

II. Métabolites secondaires des végétaux

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires; ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques (**Donatien et al, 2009**). Les catégories les plus importantes des métabolites secondaires sont :

II.1. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin « sapo », qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou à plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires en leurs molécules explique leur comportement moussant en solution aqueuse.

Ils manifestent des propriétés hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, molluscicides (**Vincken et al, 2006**), anti-inflammatoires et antalgiques (**Speroni et al, 2005**).

II.2. Les alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (**Bruneton, 1999; Zenk and Jeunger, 2007**). Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (**Stöckigt et al, 2002**).

II.3. les terpénoïdes et les stéroïdes

Issus des mêmes précurseurs, et formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (polymères de l'isoprène), les terpénoïdes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires. Comme les dérivés des acides gras, tels les acétogénines, les terpènes ont pour origine biosynthétique l'acétyl CoA ou le malonyl CoA. Néanmoins, ils ne sont pas spécifiques des végétaux puisque le squalène, le cholestérol ou encore des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent chez les animaux (**Krief, 2003**).

II.4. Les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes et synthétisées par les végétaux, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (**Bahroun, 1997**). Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales.

Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés (**Druzynka et al, 2007**). La présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Les représentants les plus nombreux (plus de 5 000 molécules isolées) et les plus connus en sont les « flavonoïdes » (**Kris-Etherton et al, 2002**).

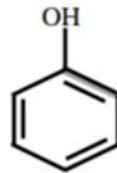


Figure 2 : Structure du noyau phénol (**Belyagoubi, 2011**)

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (agrobio). Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Leong and Shui, 2002**).

II.4.1. Classification

Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques ou polyphénols et comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes les lignines et les xanthones (**Donatien et al, 2009**).

➤ Acide phénolique

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Bruneton, 1993**). Ce sont les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. (**Donatien et al, 2009**).

➤ Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres (**Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006**). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (**Havsteen, 2002**). Ils attribuent également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, Antispasmodiques, anti-inflammatoires et diurétiques (**Bruneton, 2002**).

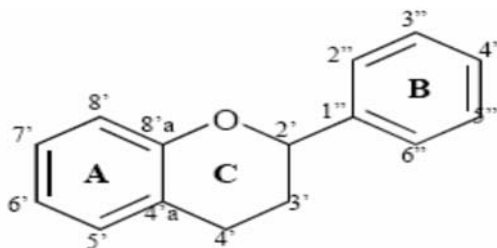


Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes (**Belyagoubi, 2011**).

➤ Tanins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Cowan, 1999; Haslam, 1996**). Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (**Scalbert, 1991**). On distingue deux groupes de tanins différents par leur structure et par leur origine biogénétique : Tanins hydrolysables, Tanins condensés ou proanthocyanidols (**Belyagoubi, 2011**).

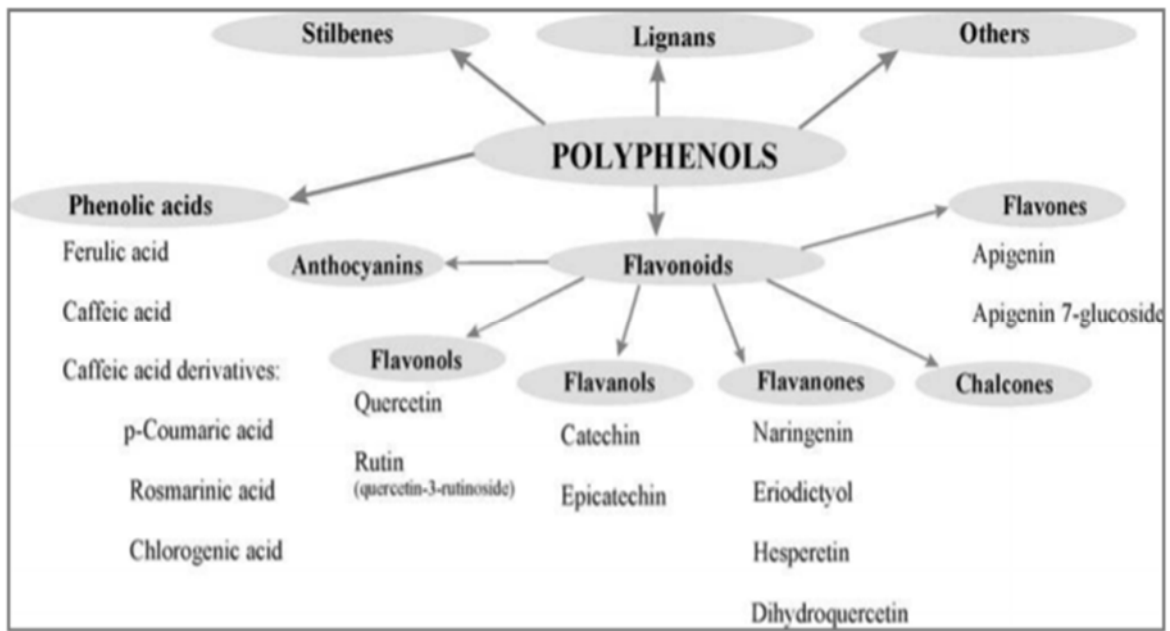


Figure 4 : Classification des polyphénols (Boros et al, 2019).

II.4.2. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols ont montré des effets protecteurs dans d'autres pathologies

Tableau II : Rôle des polyphénols (Babar et al, 2007; Manach et al, 2005)

Role	Comment ?
Effets antioxydant	Par le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production.
Effets cardiovasculaires	Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité en inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus.

Prévention des cancers	Au stade d'initiation, ils agissent comme agents bloquants en empêchant l'activation de pro carcinogènes, en piégeant les mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation des ADNs mutés. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agents supresseurs de tumeurs.
Une activité microbienne	Via l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien.

Les dérivés polyphénoliques possèdent de nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques (**figure 5**).

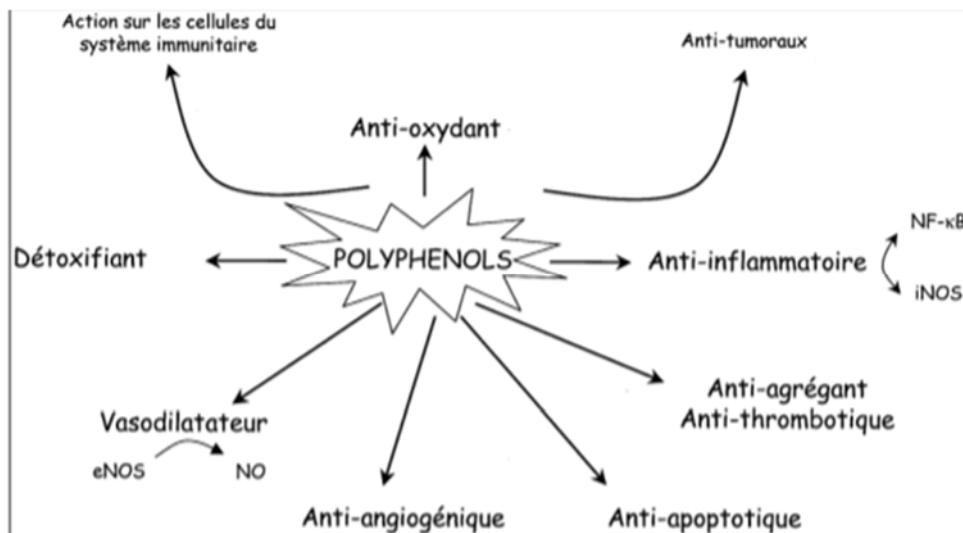


Figure 5 : Effets biologiques des polyphénols (Martin and Andriantsitohaina, 2002).

II.4.3. Polyphénols et inflammation

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de

nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Il est maintenant connu que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant *in vitro* et *in vivo* sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B.

III. Inflammation

C'est un processus de défense immunitaire de l'organisme en réponse à une agression d'origine exogène (brûlure, infection, allergie, traumatisme) ou endogène (cellules cancéreuses ou pathologies auto-immunes), dont le but est d'éliminer l'agent pathogène, réparer les lésions tissulaires et favoriser le retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé **(Ryan and Majno, 1977)**.

Les signes cliniques sont : chaleur, rougeur, gonflement et douleur. Au niveau tissulaire, la réponse inflammatoire se caractérise par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'augmentation de la dénaturation de protéines et l'altération de membranes cellulaires **(Scott et al, 2004)**. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation sanguine. Elle peut alors conduire à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés **(Barton and Yanagisawa, 2008; Nathan, 2002)**, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. **(Rousselet et al, 2005)**.

La réponse inflammatoire, qui constitue l'élément essentiel de la dynamique de l'immunité innée. Lors d'une agression par un agent pathogène spécifique non encore rencontré par l'organisme, le déclenchement immédiat de l'immunité innée assure la défense de l'organisme pendant les quelques jours nécessaires au développement d'une réponse immunitaire spécifique. **(Galanaud. P et Émilie. D, 2011)**.

La réponse inflammatoire et la réponse immunitaire peuvent prendre différentes formes pour s'adapter à l'agression. C'est la nature des premiers signaux de danger, générés par l'immunité innée, qui renseigne le système immunitaire sur le type d'agression et qui va l'aider à s'orienter vers l'un des grands types de réponses immunitaires (immunité à médiation cellulaire ou immunité humorale) et au sein de celle-ci, à choisir les outils cellulaires et moléculaires les mieux adaptés à la situation. Le déclenchement et la régulation de ces phénomènes reposent largement sur les cytokines.

Les cytokines sont des glycoprotéines intervenantes dans les communications à courte distance entre les cellules de l'organisme. Elles jouent un rôle particulièrement important dans le système de défense, où interviennent plusieurs familles de cytokines : les facteurs de croissance hématopoïétiques (nécessaires à la production accrue des leucocytes à partir de la moelle osseuse), les interleukines (nécessaires aux différentes étapes des réponses inflammatoires et immunitaires), les chimiokines (cytokines chimiotactiques, permettant l'adressage des cellules de défense dans les sites où elles sont nécessaires) (Galanaud. P et Émilie. D, 2011).

La réponse inflammatoire se déroule en trois étapes :

- Une phase **d'initiation** qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires.
- Une phase **d'amplification** avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires.
- Une phase **de résolution** et de **réparation** qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé (Zarbato, 2010).

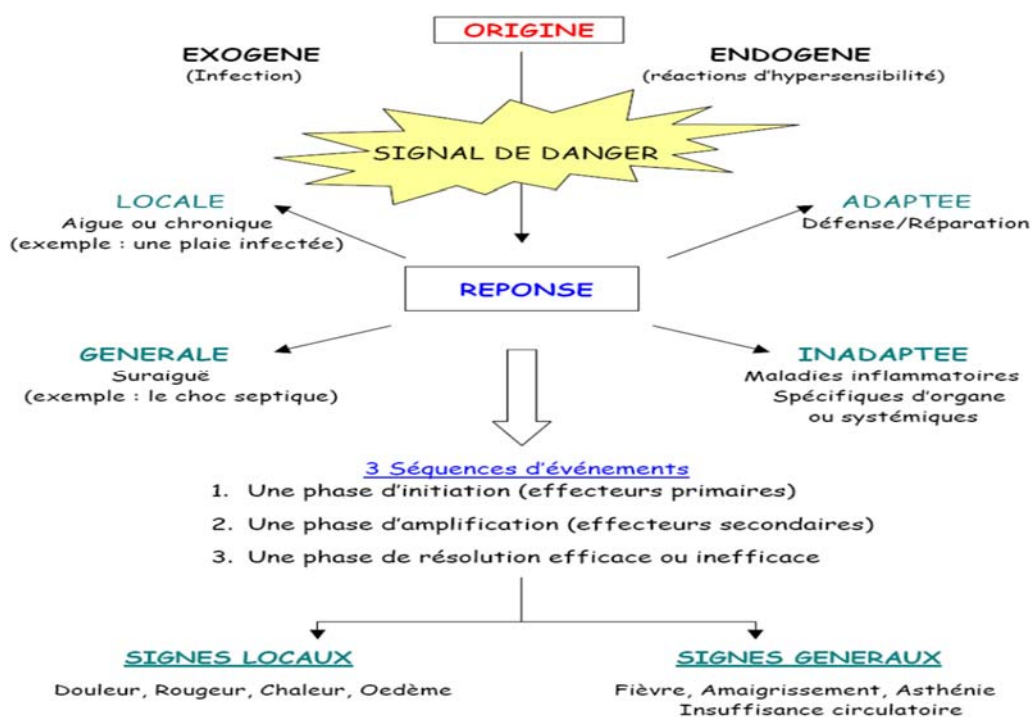


Figure 6 : La réaction inflammatoire schématisée (Zarbato, 2010).

III.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur. Elle dure de quelques jours à quelques semaines et peut être divisée en trois grandes phases (Charles et al, 2010) : une phase vasculaire immédiate ; une phase cellulaire consécutive et une phase de résolution et de cicatrisation.

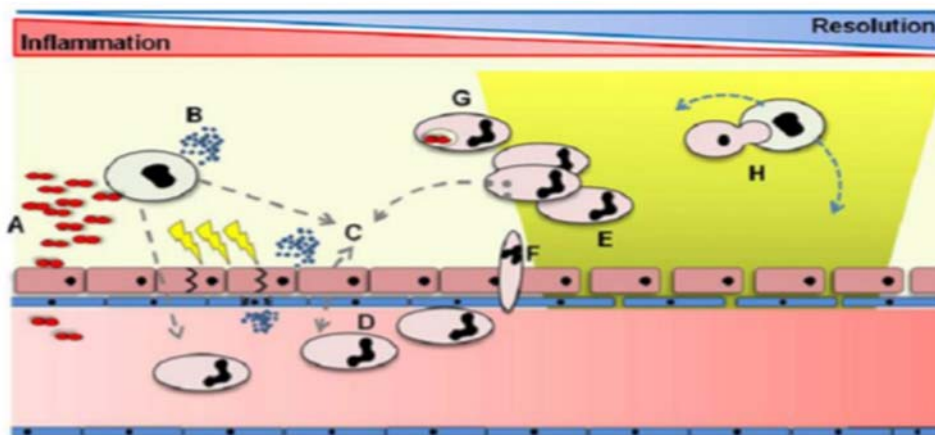


Figure 7 : L'inflammation aiguë.

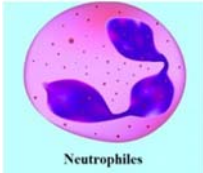
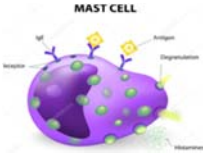
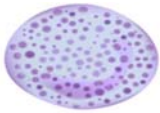



Le processus inflammatoire aiguë est déclenché par l'interaction d'organismes pathogènes (A), ou les produits tissulaires (B), avec des récepteurs de reconnaissance présents sur les cellules inflammatoires résidentes dans les tissus affectés et les cellules épithéliales environnantes. Cela conduit à la libération de différents médiateurs pro-inflammatoires (C) conduisant à l'activation des cellules endothéliales (D), de la perméabilité vasculaire (E), l'adhésion des neutrophiles, l'activation et la transmigration (F) ainsi l'activation des plaquettes et des monocytes, phagocytose (G) (Dorward et al, 2012).

III.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation prolongée, définie par la présence de cellules immunitaires. Elle peut durer plusieurs semaines voire plusieurs années (Iwalewa et al, 2007). Dans l'inflammation chronique, les phénomènes d'inflammation, de destruction tissulaire et de réparation coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation, à la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë. Celles-ci évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus (Weill et al, 2003).


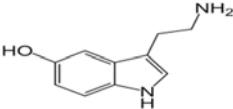
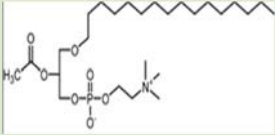
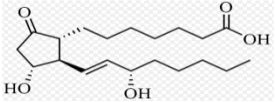

III.3. Cellules impliquées dans l'inflammation

Tableau III : Différents leucocytes intervenant au cours de la réponse inflammatoire (Serhan et al, 2010).

Type cellulaire	Fonction basique dans l'inflammation
<p>Neutrophiles</p>  <p>Neutrophiles</p>	<p>Migrent vers le tissu extravasculaire, ont des propriétés phagocytaires et sont activés par des chimio-attracteurs dans le site de l'agression.</p>
<p>Mastocytes</p>  <p>MAST CELL</p>	<p>Cellules phagocytaires, résidentes dans les tissus de connections et dans les muqueuses. Libèrent de médiateurs inflammatoires (essentiellement anaphylactiques).</p>
<p>Basophiles</p>  <p>Basophile</p>	<p>Migrent vers le tissu extravasculaire et ont des propriétés phagocytaires. Interviennent dans les réactions allergiques.</p>
<p>Eosinophiles</p>  <p>Eosinophile</p>	<p>Migrent vers le tissu extravasculaire où ils peuvent survivre plusieurs semaines. Ils ont des propriétés phagocytaires et interviennent dans les infections parasitaires.</p>
<p>Plaquettes</p>  <p>Plaquettes</p>	<p>Source initiales de médiateurs inflammatoires et interviennent aussi dans la cascade de coagulation.</p>
<p>Monocytes</p>  <p>Monocyte</p>	<p>Se différentient en macrophages tissulaires, dans le foie, les poumons... où ils peuvent y survivre pendant des années. Ce sont de puissants phagocytes, ils sont impliqués dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et B et dans la libération des médiateurs inflammatoires.</p>

III.4. Médiateurs de l'inflammation

Tableau IV : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire (Davoine and Lacy, 2014; Male, 2005; Rankin, 2004).

Médiateurs	Origines	Effets
<p>Histamine</p> 	<p>Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes</p>	<p>Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.</p>
<p>Sérotonine</p> 	<p>Mastocytes et plaquettes</p>	<p>Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.</p>
<p>Facteurs d'activation plaquettaire (PAF)</p> 	<p>Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales</p>	<p>Vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule l'agrégation des plaquettes, induit la production des ROS et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.</p>
<p>Prostaglandine</p> 	<p>Essentiellement par les leucocytes</p>	<p>Vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.</p>
<p>Cytokines</p> 	<p>Macrophages et les lymphocytes</p>	<p>Elles agissent sur des récepteurs membranaires, elles peuvent être pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, ou le TNFα) ou encore anti-inflammatoires (IL-10). Intervient dans la réparation tissulaire.</p>

III. 5. Anti-inflammatoires

III.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments aux propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (**Cuvillon and Viel, 2002**). Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, en inhibant la synthèse de prostaglandines qui ont un rôle dans l'agrégation plaquettaire et la protection de l'estomac, sont responsables des événements défavorables, en gênant ainsi l'agrégation plaquettaire et donc la coagulation du sang, ce qui peut prévenir la formation des caillots (thrombose), mais aggrave les hémorragies; en provoquant aussi des problèmes gastro-intestinaux (ulcères), rénaux et d'hypersensibilité (**Jick, 1994; Risser et al, 2009**).

III.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Les glucocorticoïdes (GC) traversent librement les membranes cellulaires, se fixent sur des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et migrent vers le noyau et agissent directement sur l'ADN en se fixant sur des séquences spécifiques, dites GRE (Glucorticoid Response Element). Les GC peuvent augmenter la transcription des gènes anti-inflammatoires et inhiber l'action de certaines protéines nucléaires transactivatrices, dont le NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) et la protéine activatrice-1 (AP-1), inhibant ainsi l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-2, TNF- α) (**Barnes, 1998; Rhen and Cidlowski, 2005**).

III.5.3. Anti-inflammatoires naturels

La phytothérapie est utilisée depuis toujours dans la médecine traditionnelle. Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans les plantes médicinales est très vaste, et leurs spectre d'activité est tout aussi grand (**Barnes, 1998**).

Les effets anti-inflammatoires des polyphénols, qui peuvent être exercées au niveau moléculaire, sont dépendants de la structure spécifique des composés polyphénoliques. Les fonctions de macrophage, y compris la production de cytokines, peut également être affectée par certains flavonoïdes par la modulation de la cyclo-oxygénase inducible (COX-2) et l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS). Plusieurs études expérimentales ont rapporté les effets immunomodulateurs des composés polyphénoliques sur l'immunité humorale et cellulaire (**Madhuri et al, 2008; Neyestani, 2008**).

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel Animal

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris femelles, *Swiss albinos* dont le poids varie entre 20 et 25 g pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire, et de 28 et 37 g pour l'étude de la rectocolite. Ils ont été procurés du Centre de Recherche et de Développement (CRD) SAIDAL-Alger.

Les animaux ont été hébergés dans des cages de polypropylène dans des conditions d'éclairage normales (12 h de lumière / 12 h d'obscurité). Les locaux sont dotés d'une climatisation dynamique avec une température de 20-24 °C, avec un taux d'humidité de 50 ± 10 %. Ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard.

I.2. Matériel végétal

Les graines de pin d'Alep « *Pinus halepensis* Mill. » ont été récoltés à Setif (Ain Ouelmane) et acheté chez un herboriste dans la commune de Tazmalt, Bejaia.

I.3. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés sont tous de grade analytique.

Hexane et éthanol fournis par *Prolabo.*, acide acétique (C₂H₄O₂), acide gallique de *Sigma*, trichlorure d'aluminium (AlCl₃), le Folin-Ciocalteu (FCR) par *Biochem*, bicarbonate de sodium (NaCO₃) de *Sigma*, la carragénine, ibuprofène et dexamétasone.

II. Méthodes

II.1. Extraction et préparation des extraits

Une fois nettoyées, les graines de *Pinus halepensis* Mill ont été séchées à l'air libre puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.

II.2. Préparation de la poudre délipidée

La délipidation de la poudre a été réalisée selon le protocole de (**Cheikh-Rouhou et al, 2008**). Une masse de 50 g de la poudre a été délipidée dans 250 ml d'hexane pendant 4h d'agitation puis centrifugée 1000×g et filtrée (Whatman no. 2). La procédure d'extraction a été répétée deux fois.

II.2.1. Préparation de l'extrait aqueux

✓ Infusion

L'extrait aqueux a été préparé selon la méthode de (Cheurfa and Allem, 2015). Une masse de 10 g de poudre de graines délipidée de *P. halepensis* Mill a été rajouté dans un récipient qui contenant 100 ml d'eau bouillante. Après 15 minutes de contact, l'extrait aqueux a été récupéré par filtration sur papier Wattman. Le filtrat obtenu a été concentré au Rotavapeur à la température de 40 °C pendant 2h.

II.2.2. Préparation de l'extrait éthanolique

✓ Macération

L'extrait éthanolique des graines *P. halepensis* Mill a été préparé selon la méthode décrite par (Coulibaly et al, 2011) avec une légère modification : Une masse de 10 g du matériel végétal broyé a été mise à macérer dans 100 ml d'éthanol pendant 48h. Les macérats obtenus sont soumis à une filtration sur papier-filtre Whatman no 1. Le solvant a été éliminé en utilisant un évaporateur rotatif à vide (HS-2005V-N) à 48 ° C.

Le rendement d'extraction a été calculé suivant la formule ci-dessous :

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

R (%) : Rendement en %.

M0 : Masse du bécher vide.

M1 : Masse du bécher après évaporation.

M : Masse de matière sèche.

III. Évaluation des taux des composés phénoliques

III.1. Dosage des polyphénols totaux

✓ Principe

Le réactif de folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits obtenus (Boizot and Charpentier, 2006).

Les polyphénols totaux des extraits ont été déterminés par utilisation de la méthode de Follin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme standard (**Singleton and Rossi, 1965**).

✓ Mode opératoire

Un volume de 5 ml d'eau distillée a été ajouté à 200µl de chaque extrait (préparé avec des dilutions convenables), après agitation, 1 ml de la solution de Folin-Ciocalteu (dilué dix fois dans l'eau distillée) a été ajouté à l'ensemble et laissé reposer 3 min, puis 0,8 ml de la solution de carbonate de sodium à 10% ont été additionnés. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été lue à 765nm (**Kähkönen et al, 1999**).

Le taux des polyphénols dans les extraits des graines de *P. halepensis* Mill, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique comme standard de référence (**Annexe 1**). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme (mg EAG / g d'extrait) (**Talbi et al, 2015**).

La quantité des phénols totaux a été calculée par l'équation suivante :

$$C = c * v / m$$

Avec :

C = contenu totale des phénols (mg EAG / g d'extrait).

c = concentration des extraits EAG, obtenu à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

v = volume de l'extrait (ml).

m = masse de l'extrait pur de la plante (g).

L'expérience a été faite en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type.

III.2. Dosage des flavonoïdes

✓ Principe

La méthode colorimétrique de dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl₃), qui

donne à la solution une coloration jaunâtre dans l'absorption maximale et la longueur d'onde à 415 nm, contre un témoin (**Djeridane et al, 2006**).

✓ Mode opératoire

Un volume de 1 ml d'une solution éthanolique d'AlCl₃ (2%) a été ajouté à 1 ml d'échantillon. Après 1 h d'incubation à la température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 420 nm (**Wu et al, 2009**). Une courbe d'étalonnage établie par la quercétine (**Annexe 2**), servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur totale en flavonoïdes des extraits de plantes a été exprimée en milligrammes équivalent de quercétine par gramme de poudre de plante (mg Eq Q/ g).

L'expérience a été faite en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type.

IV. Activité anti-inflammatoire

✓ Principe des deux méthodes

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des graines de *P. halepensis* Mill. Les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème aigue de la patte de souris induit par la carragénine administrée par voie orale.

IV.1. Méthode de pied à coulisse

✓ Mode opératoire

Le test consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux sur l'œdème de pattes postérieures. Le gavage a été réalisé 30 mn avant l'induction d'une inflammation aiguë avec de la carragénine à 1 % selon le protocole de (**Levy, 1969**).

La veille de l'expérimentation, 4 lots de 5 souris de 23 - 27 g ont été constitués, pesés, identifiés et mis à jeun pendant 16h (**figure 8**).

La préparation des solutions administrées est illustrée en (**Annexe 4**).

-**A temps T0** : le diamètre initial de la patte gauche des souris a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse digital. Puis, les produits sont été administrés :

Tableau V : Les différents traitements administrés chez les lots témoin, référence et essai.

Lot Témoin	Lot Référence	Lot Essai
<ul style="list-style-type: none">Reçoit 0,5 ml /souris d'eau distillée.	<ul style="list-style-type: none">Reçoit 0,5 ml/souris d'Ibuprofen 400 mg ou autre anti-inflammatoires.	<ul style="list-style-type: none">Reçoit 0,5 ml/souris d'extrait de poudre ou d'infusé.

-A temps T0+30 min : injection d'une solution de carragénine au niveau de la patte postérieure gauche au milieu de l'aponévrose du coussinet plantaire sous un volume de 0,1 ml pour chaque souris des lots. Puis mesurer l'épaisseur de l'œdème chaque 1h pendant 4h à l'aide d'un pied à coulisse digital.

Expression des résultats :

- a) Pourcentage d'œdème pour chaque 1h suivant la formule :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{Eth} - \text{Et0}}{\text{Dt0}}$$

Avec :

Eth : épaisseur d'œdème de la patte à temps initial.

Et0 : épaisseur d'œdème de la patte par heure.

- b) Pourcentage d'inhibition d'œdème :

$$\% \text{ d'inhibition d'œdème} = \left(\frac{\% \text{OT} - \% \text{OE}}{\% \text{OT}} \right) \times 100$$

Avec:

%OT: pourcentage d'œdème du groupe témoin.

%OE: pourcentage d'œdème du groupe essai.



Constitution des 4 lots (5 souris pour chaque lot)



Mesure du diamètre initial de la patte gauche des souris à l'aide d'un pied à coulis digital.



T0 : Administration des produits par gavage



T0+30 min : injection d'une solution de carragénine au niveau de la patte postérieure gauche au milieu de l'aponévrose sous un volume de 0,1 ml



Mesure de l'épaisseur de l'œdème chaque 1h pendant 4h à l'aide d'un pied à coulisse digital.

Figure 8 : Protocole expérimentale de l'activité anti-inflammatoire (méthode de pied à coulisse).

IV.2. Méthode de couper les pattes

✓ Mode opératoire

Les mêmes étapes que la méthode du pied à coulisse ont été réalisées, seulement après 4h les souris ont été sacrifiées et le découpage des pattes postérieures à hauteur de l'articulation a été réalisé selon la méthode de (Levy, 1969).

✓ Expression des résultats

L'importance de l'œdème a été appréciée par la détermination du pourcentage d'augmentation du volume de la patte de la souris. Le pourcentage d'augmentation de l'œdème pour chaque groupe a été calculé par la formule suivante (Colot, 1972):

$$\% \text{ de l'œdème} = (mg - md) / md \times 100$$

Avec :

mg : moyenne des pattes gauches.

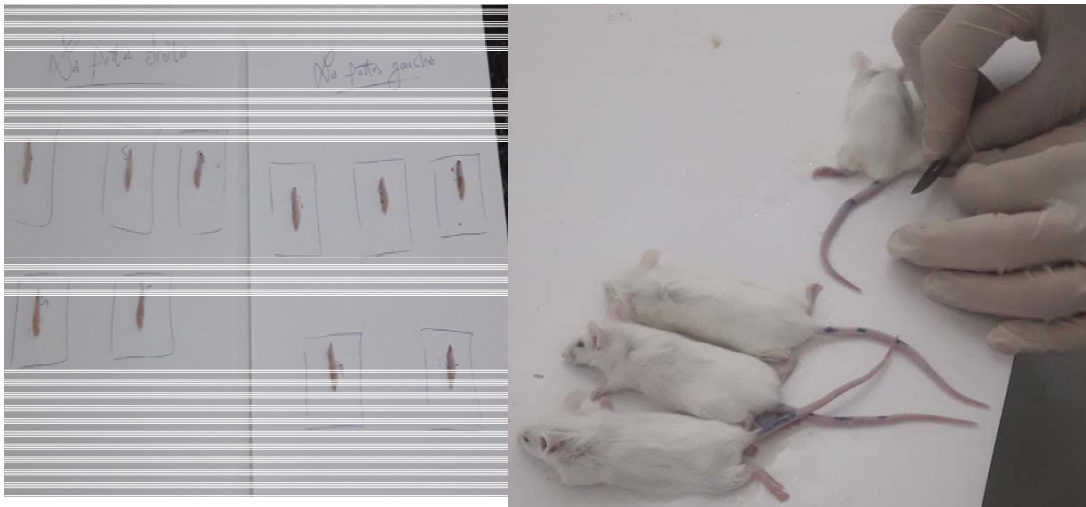
md : moyenne des pattes droites.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée grâce au calcul du pourcentage d'inhibition (réduction) de l'œdème selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = (\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}) / \% \text{ de l'œdème témoin} \times 100$$



Après 4h : sacrifice des souris par une dislocation cervicale



Découpage des pattes postérieures à hauteur de l'articulation



les pattes gauches et droites ont été pesées sur une balance analytique.

Figure 9 : Protocole expérimentale de l'activité anti-inflammatoire (méthode de couper les pattes).

V. Évaluation de l'activité intestinale rectocolite

✓ Principe

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des graines de *P. halepensis* Mill sur la colite, l'acide acétique à 5% a été injecté par voie rectale pour l'induction de la rectocolite.

✓ Mode opératoire

L'expérience a été réalisée sur des souris femelles du type *Swiss albinos*, pesant entre 28g et 37g. L'expérimentation a été réalisée selon le protocole de (Wang et al, 2008) avec quelques modifications.

-La veille de l'expérimentation, 4 lots de 6 souris de (28 - 37 g) ont été constitués, puis pesés, identifiés et mise à jeun pendant 12h.

-La préparation des solutions administrées est illustrée en (Annexe 3).

-La recto-colite a été induite en administrant 0,2 ml d'acide acétique à 5% par voie rectale à l'aide d'une sonde ou d'un cathéter en plastique flexible d'une longueur de 4 cm en maintenant l'animal en position tête en bas pendant 20 à 30 s pour éviter la fuite de l'acide acétique intracolique.

Puis, 2h après l'induction de la rectocolite (après injection de l'acide acétique), les produits à tester ont été administré :

Tableau VI : Les différents traitements appliqués.

Lot témoin (-)	Lot acide acétique	Lot référence (+)	Lot essai
-Reçoit 0,5 ml/souris d'eau distillée.	-Reçoit 0,2 ml/souris d'acide acétique.	-Reçoit 0,5ml/souris de dexamethasone.	-Reçoit 0,5ml/souris d'extrait de plante.

Enfin, l'observation des scores cliniques a été réalisée pendant 7 jours :

- Evaluation pondérale.
- Consistance des selles (dur, moelle, diarrhée) et couleur.
- Saignement rectale.

✓ **Score :**

Tableau VII : Les différents scores cliniques (Cooper et al, 1993).

Perte de poids	Selles hémorragique	Consistance des selles	Score macroscopique
✓ 0 : aucune perte.	✓ 0 : népathie.	✓ 0 : normal.	✓ 1 et 2 : érythème
✓ 1 : 1-5%.	✓ 2 : saignement léger.	✓ 1 et 2 : selles molles.	muqueux, érosion et ulcération légère.
✓ 2 : 5-10%.	✓ 4 : saignement important.	✓ 3 et 4 : diarrhée.	3 et 4 : ulcération grave, érosion sévère.
✓ 3 : 10-20%.			
✓ 4 : >20%.			

✓ **Expression des résultats :**

L'activité anti-inflammatoire est exprimée

- Indice de l'activité de la maladie (IAM) : C'est la somme des trois scores (perte de Poids + score hémorragie + score consistance des selles).

Tableau VIII : scores macroscopiques.

Score	Signification
0	RAS
1 et 2	RAS
3 et 4	Faible
4 et 5	IAM
>5	importante (mortalité).

Avec :

RAS : rien à signaler.

IAM : indice de l'activité de la maladie

-Ensuite, le huitième jour les souris ont été sacrifiées et les colons ont été récupérés et rincés avec de l'eau physiologique.

-La longueur de chaque colon des différents lots a été prise de la jonction ileo-coecale au rectum proximal à l'aide d'un pied à coulisse digital.

Le colon a été pesé à l'aide d'une balance.

-Enfin, l'étude des coupes histologiques a été réalisée.



Constitution des lots (6 souris dans chaque lot)



Induction de 0,2 ml d'acide acétique à 5% par voie rectale.



Administration des produits à tester par gavage.



Observation des scores cliniques pendant 7 jours.



Sacrifice des souris de chaque lot.

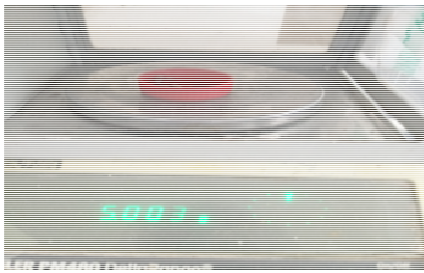


Dessiccation des souris.



Prendre la longueur du colon des différents lots.





Prendre le poids de chaque colon.

Figure 10 : Protocole expérimentale de l'activité recto-colite.

- **Etude histologique**

L'histologie (du Grec istos, tissu) est la branche de la biologie qui étudie les tissus, à mi-chemin entre la cytologie et l'anatomie. Elle a pour but d'explorer la composition, la structure, le renouvellement des tissus, ainsi que les échanges cellulaires en leur sein (Dubois et al, 2007).

Pour préparer les échantillons à analyser et rendre visible ce que l'on veut observer, il est nécessaire de mettre en œuvre différents traitements que l'on applique au matériel biologique. L'histologie fait donc appel à plusieurs étapes :

- ✓ **Prélèvement**

Le prélèvement a été fait par dissection, les échantillons doivent être effectués aussitôt que possible après la mort de l'animal. Les colons ont été manipulés avec la plus grande délicatesse, les instruments utilisés (pince à os, scalpel, ciseaux) pouvant déformer, voir définitivement endommager l'échantillon.

- ✓ **Fixation**

Le colon a été conservé dans le formol jusqu'à son utilisation.

- ✓ **Découpage et rinçage**

Deux petits morceaux de chaque colon d'épaisseur de 5mm et de longueur de 1 à 1,5 cm ont été prélevés, puis découpés l'un en coupe transversale et l'autre en coupe longitudinale. Ensuite, ils ont été placés dans des cassettes et rincés pendant 5 min dans un bain d'eau physiologique.

- ✓ **Déshydratation**

Les cassettes ont été mises dans des bains de différentes concentrations d'alcool 70°, 90°, 100°, afin de remplacer l'eau par l'alcool parce que la paraffine n'est pas miscible à

l'eau, donc la pièce anatomique a été entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine. Le bain a été changé chaque 1 h et l'opération a été répétée deux fois pour chaque bain.

✓ **Eclaircissement et imprégnation**

La paraffine n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation donc les cassettes ont été mises dans deux bains de toluène afin de remplacer l'alcool par le toluène (pendant 1h pour chaque bain). Ensuite, les cassettes ont été imprégnées dans un bain de paraffine liquide de 54 ° à 58 °C pendant 12 h pour avoir un tissu rigide.



Figure 21 : déshydratation, éclaircissement et imprégnation des cassettes.

✓ **Inclusion**

L'inclusion a été faite dans des moules permettant la confection de blocs de paraffine qui se montent ensuite sur le microtome.

✓ **Microtome**

- Le bloc a été monté dans le porte-bloc du microtome.
- Le couteau a été réglé de manière à dresser une face de coupe nette.
- L'épaisseur de coupe définitive (fine) a été réglée.
- Procéder à la confection du ruban de coupes.



Figure 32 : réalisation de coupe fine à l'aide d'un microtome.

✓ Etallement et séchage

La coupe a été dépliée par flottaison à la surface d'un bain chaud puis elle a été posée sur la lame. Ensuite, le collage était fait par chauffage de la lame sur une platine chauffante.



(A)



(B)

Figure 43 : bain chaud (A), platine chauffante (B).

✓ Déparaffinage

Les lames ont été mises dans toluène 1 pendant 5 min puis en toluène 2 pendant 7 min pour déparaffiner.

✓ Hydratation

Les lames ont été imprégnées dans trois bains d'alcool de différentes concentrations 100°, 90°, 70°, laisser chacun pendant 1 min. Puis, ils ont été lavés dans trois bains d'eau et laissée dans chacun 1 min.

✓ Coloration

Le noyau a été coloré avec l'hématoxyline de Harris pendant 1 min 45 s puis lavé les lames dans trois bains d'eau pendant 20 s, 30 s, 2min 10 s respectivement. Ensuite, les lames ont été mises dans l'éosine pendant 7min afin de colorer le cytoplasme.

✓ **Déshydratation**

La déshydratation était faite dans 3 bains d'alcool de différentes concentrations 70°, 90°, 100°.

✓ **Eclaircissement**

Les lames ont été imprégnées dans deux bains de toluène 1 et 2 chacun pendant 5min pour éliminer l'alcool.



Figure 54 : les différentes étapes de déparaffinage à l'éclaircissement.

✓ **Montage**

Le montage était fait classiquement entre lame et lamelle en utilisant la résine pour mieux visualiser l'observation.

✓ **Lecture des lames**

La lecture des lames a été réalisée au microscope optique (LEICA DM500) grossissement x 10 et Gx40.

Résultats et Discussion

I. Rendement d'extraction

Dans cette étude, le rendement (l'extrait sec, obtenu après évaporation, contenant les composés phénoliques) a été déterminé par rapport à 10 g de la matière végétale pour l'extrait aqueux et 10 g pour l'extrait éthanolique.

Le poids de l'extrait sec a été déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

Les résultats de cette manipulation sont représentés dans le **tableau IX**.

Tableau IX : Poids d'extraits secs et rendement correspondant des deux extraits des composés phénoliques à partir des graines de *Pinus halepensis* Mill.

Extraits	Poids d'extrait sec (g)	Rendement (%)
Aqueux	1,6	16
Ethanolique	0,83	8,3

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, du **tableau IX** que l'eau donne le meilleur rendement d'extraction soit un pourcentage de 16%, alors que l'éthanol donne le plus faible rendement (8,3%). Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale. Il dépend de plusieurs paramètres tels que : le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon (**Do et al, 2013**).

D'après (**Bruneton, 1999**), la variation des résultats d'un extrait à l'autre est due principalement aux solvants d'extraction utilisés, dont les solvants polaires montrent un meilleur rendement d'extraction par rapport aux solvants moins polaires. La différence de polarité des solvants utilisés permet l'extraction d'une large gamme de métabolites secondaires (**Green, 2004**).

Il y a également une autre raison qui pourrait avoir un impact sur le rendement d'extraction, c'est le temps d'extraction qui est généralement très long dans le cas de la première méthode (48 heures) par rapport à la deuxième méthode (15 min). Selon (**Rhazi et al, 2015**), la progression de temps d'extraction peut diminuer le rendement de l'extrait et cela peut être dû à la dégradation de certaines substances naturelles comme les polyphénols.

II. Taux en phénols totaux et flavonoïdes

La teneur en phénols totaux et flavonoïdes est déterminées à partir des courbes d'étalonnage ($y = 0,005x + 0,0485$, $R^2 = 0,9956$) (**annexe 1**) et ($y = 0,0123x + 0,242$, $R^2 = 0,9994$) (**annexe 2**) tracées en utilisant comme standard l'acide gallique et la quercétine, respectivement. Les concentrations sont exprimées en mg EAG/ g E pour les phénols totaux et en mg EQ/ g E pour les flavonoïdes.

Les résultats de la teneur en phénols totaux et flavonoïdes sont illustrés dans le **tableau X**.

Tableau 1 : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/ gE) et en flavonoïdes (mg EQ/ gE) des différents extraits.

Extraits	Polyphénols totaux mg EAG/ g E	Flavonoïdes mg EQ/ g E
Ethanolique	6,55 ± 0,31	0,63 ± 0,03
aqueux	5,77 ± 0,29	0,94 ± 0,27

Les résultats montrent que l'extrait éthanolique du *P. halepensis* Mill possède une teneur plus élevée en polyphénols totaux qui est de l'ordre de $6,55 \pm 0,31$ mg EAG/ g E par rapport à celui d'extrait aqueux $5,77 \pm 0,29$ mg EAG/g E. La teneur en flavonoïdes enregistrée quant à elle est égale à $0,63 \pm 0,03$ mg EQ/ g E qui est plus faible que celle trouvé dans l'extrait aqueux $0,94 \pm 0,27$ mg EQ/ g E.

A partir de ces données, on peut déduire que les polyphénols représentent la fraction majoritaire par rapport aux flavonoïdes dans les deux extraits l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux.

Selon l'étude menée par (**Kadri et al, 2014**) faite sur les graines de *P. halepensis* Mill, les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes trouvées dans l'extrait méthanolique (50%) sont de 3,71 mg EAG/ g E et 0,80 mg EQ/ g E respectivement. Ces valeurs sont différentes de celles obtenues avec cette étude. Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, la localisation géographique (**Ryan et al, 1999**), les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante, la température et le solvant d'extraction (**Conde et al, 2009**).

II. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

II.1. Méthode de pieds à coulisse

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique des graines de *P. halepensis* Mill sur l'activité anti-inflammatoire, les tests ont été réalisés sur le modèle de l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine à 1%.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire obtenus ont été comparés à ceux d'Ibuprofène (lot référence) et au lot témoin. L'évolution de l'inflammation pour les différents lots est représentée par l'**annexe 4**.

Le développement de l'œdème induit par la carragénine sur les différents lots a été observé et mesuré.

II.1.1. Extrait aqueux

Tableau XI : effet de l'extrait aqueux des graines de *Pinus halepensis* Mill et de l'Ibuprofène sur l'œdème induit par la carragénine.

lots	1h	2h	3h	4h
Témoin moy (mm)	2,15 ±0,35	1,98 ±0,41	1,97	1,95 ±0,15
Référence moy (mm)	1,88 ±0,44	1,64±0,27	1,54±0,27	1,41±0,20
Essai moy (mm)	1,68±0,22	1,58±0,13	1,49±0,05	1,50±0,14
% œdème témoin	40,52	29,41	20,31	9,80
% œdème référence	13,74	5,09	Pas d'œdème	Pas d'œdème
% œdème essai	25,37	17,91	11,19	11,94
% réduction référence	51,28	82,69	100	100
% réduction essai	37,38	55,79	72,38	70,53

L'administration de l'extrait aqueux des graines de *P. halepensis* Mill à la dose de 16 mg/ml prévient de façon significative l'œdème de la patte de la souris (au bout de 1 h, 2 h,

3 h et 4 h) selon les moyennes des diamètres obtenues après les avoir mesuré (1,68±0,22 mm, 1,58±0,13 mm, 1,49±0,05 mm, 1,50±0,14 mm) et selon le pourcentage d'œdèmes respectifs (25,37%, 17,91%, 11,19%, 11,94 %). L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que l'extrait aqueux des graines de *P. halepensis* Mill possède une activité anti-inflammatoire.

D'après les résultats obtenus, on constate une augmentation de l'œdème induit par la carragénine pour le lot témoin. On observe une réduction de l'œdème chez les souris du lot essai traité par l'extrait aqueux (16 mg/ml) par rapport aux souris du lot témoin (25,37% jusqu'à 11,94%) ce qui signifie la présence d'une inhibition (réduction) de l'inflammation de 70,53% (**tableau XI**).

Une diminution de l'inflammation après l'administration de l'Ibuprofène (2 mg/ml) a été observé avec un pourcentage d'inhibition de 82,69% par rapport aux souris témoins.

II.1.2. Extrait éthanolique

Tableau XII : effet de l'extrait éthanolique des graines *Pinus halepensis* Mill. et l'Ibuprofène sur l'œdème induit par la carragénine.

lots	1h	2h	3h	4h
Témoin moy (mm)	2,15±0,35	1,98±0,41	1,97±0,35	1,68±0,15
Référence moy (mm)	1,88±0,27	1,64±0,44	1,54±0,27	1,41±0,20
Essai moy (mm)	1,57±0,23	1,51±0,17	1,40±0,15	1,25±0,20
% œdème témoin	40,52	29,41	20,31	9,80
% œdème référence	13,74	5,09	Pas d'œdème	Pas d'œdème
% œdème essai	35,34	30,17	20,68	7,75
% réduction référence	51,28	82,69	100	100

% réduction essai	12,78	25,54	48,96	80,87
-------------------	-------	-------	-------	-------

L'extrait éthanolique des graines de *P. halepensis* Mill (8,3 mg/ml) réduit de façon significative l'œdème de la patte de la souris au bout des 4h (pourcentage d'œdèmes respectifs de 35,34%, 30,17%, 20,68%, 7,75%), ce qui nous confirme une installation d'un effet anti-inflammatoire.

Une augmentation de l'œdème induit par la carragénine a été observée pour le lot témoin. Chez les souris du lot essai traité par l'extrait éthanolique (8,3 mg/ml), une diminution de l'œdème (35,34% jusqu'à 7,75%) par rapport aux souris du lot témoin (40,52% jusqu'à 9,80) a été observée, ce qui signifie un pourcentage de réduction de l'inflammation de 80,87% (**tableau XII**).

Le même résultat a été observé après l'administration de l'Ibuprofène (2 mg/ml) avec un pourcentage de réduction de l'inflammation de 82,69% par rapport aux souris témoins.

II.2. Méthode de couper les pattes

Cette étude vise à évaluer les propriétés anti-inflammatoires des deux différents extraits aqueux et éthanolique des graines *P. halepensis* Mill sur un modèle d'œdème des pattes postérieures induit par la carragénine 1%.

L'évaluation de l'œdème induit par la carragénine sur les différents lots a été observée et pesé. Les résultats sont présentés dans le **tableau XIII**.

Tableau XIII : effet de l'extrait aqueux graines *P. halepensis* Mill et l'Ibuprofène sur l'œdème de la patte induit par la carragénine.

Lot	Md (moy en g)	Mg (moy en g)	% de l'œdème	% de réduction de l'œdème
Essai (extrait aqueux)	0,150±0,017	0,125±0,004	20	57,72
Essai (extrait éthanolique)	0,136±0,0065	0,132±0,0065	3,03	93,59
Témoin	0,0758±0,008	0,109±0,011	43,79	0
Référence (ibuprofen)	0,133±0,02	0,169±0,01	21,58	51,31

Avec :

Md: moyenne des pattes droites.

Mg: moyenne des pattes gauches.

Les résultats montrent une augmentation du poids d'œdème après l'injection de carragénine chez le lot témoin (de 0,0758 g jusqu'à 0,109 g). Un œdème de la patte de 43,79% a été développé chez les souris du lot témoin (**tableau XIII**).

Pour les souris du lot traité par l'extrait aqueux, une diminution d'œdème par rapport au lot témoin (de 43,79% jusqu'à 20%) a été observé, ce qui représente un pourcentage d'inhibition de 57,72% (**tableau XIII**). Contrairement aux souris de lot témoin qui ne démontre aucune réduction de l'œdème.

L'injection d'ibuprofène 2 mg/ml a révélé une réduction de développement de l'inflammation par rapport au lot témoin avec un pourcentage de diminution de 51,31%.

En établissant une comparaison entre le lot de souris traité avec l'extrait aqueux et le lot de souris traité par l'ibuprofène, on trouve que le pourcentage d'inhibition de lot

traité avec l'extrait aqueux est supérieur à celui du lot référence (57,72% > 51,31%), ce qui signifie que l'extrait aqueux a un effet considérable.

Les résultats montrent une augmentation du poids d'œdème après l'injection de carragénine chez le lot témoin (de 0,0758 g jusqu'à 0,109 g). Un œdème de la patte de 43,79% a été développé chez les souris du lot témoin (**tableau XIII**).

Chez les souris du lot référence traitées par Ibuprofène, on constate une diminution du poids de la patte gauche avec un % d'œdème de 21,58% par rapport à celle des souris du lot témoin 43,79% et une inhibition d'œdème considérable de 51,31% donc inhibition de l'inflammation.

Les résultats du pourcentage d'inhibition révèle que l'extrait éthanolique de *P. halepensis* Mill à une concentration de 8,3 mg/ml présente un pourcentage de réduction plus élevé que celui de l'Ibuprofène.

Selon l'étude menée par AMEZOUAR et al, l'administration de l'extrait éthanolique de *E. arborea* aux doses de 200 et de 400 mg/kg prévient de façon significative ($p < 0,05$) l'œdème plantaire chez le rat à partir de la deuxième heure du traitement. Le traitement avec ces doses provoque un effet inhibiteur de l'inflammation important. A la troisième heure, l'extrait éthanolique montre respectivement un pourcentage d'inhibition de $42,7 \pm 1,7$ % et $59 \pm 0,5$ %. L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que cet extrait possède une activité anti-inflammatoire. Les résultats obtenus sont comparables aux résultats de cette étude.

L'inflammation est caractérisée par plusieurs symptômes, comme la rougeur, le gonflement et la douleur donc la mesure de l'œdème est un bon outil pour la quantification de l'inflammation induite par l'injection de la carragénine qui est agent phlogogène (induit au niveau de la patte un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et paramètre important dans l'évaluation de l'activité anti -inflammatoire de plusieurs composés) (**Kirkova et al, 1995**). La carragénine est une mucopolysaccharide sulfaté provenant d'une Rhodophyceae, elle provoque une inflammation typiquement liée à l'activation de la cyclooxygénase (**Di Rosa, 1972**). Cette inflammation est biphasique. En effet, il est connu que, chez l'animal vivant, la carragénine dans une première phase provoque la synthèse de médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine. Ces facteurs provoquent des modifications vasculaires qui

conduisent à l'exsudation plasmatique (Di Rosa, 1972). Dans une seconde phase, cette molécule de référence induit la synthèse de prostaglandines principalement, de protéases et de lysosomes. Durant la phase tardive de ce processus inflammatoire (4-12h), ces facteurs chimio attractants induisent le recrutement des neutrophiles par chimiotactisme envers le site inflammatoire, où ils libèrent leur arsenal cytotoxique et d'autres médiateurs inflammatoires (Carol et al, 1997).

Les résultats obtenus à l'issue du test anti-inflammatoire montre que l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique, des graines de *P. halepensis* Mill, réduisent de façon appréciable l'œdème induit par la carragénine, la richesse des deux extraits de la plante en différents constituants chimiques peut justifier cette activité. Ces effets anti-inflammatoires ont été attribués principalement à la présence dans les graines de *P. halepensis* Mill de différents composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes). Ces composés ont le pouvoir d'inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires tel que les leucotriènes, et les prostaglandines (PGI₂, PGD₂ et PGE₂). Les flavonoïdes trouvés lors des criblages photochimiques (Romani et al, 2002 ; Luigia et al, 2007), peuvent expliquer cet effet anti-inflammatoire. En effet, l'application topique de la quercétine et la myricétine exerce une forte inhibition sur la cyclooxygénase (COX) (Kim et al, 1998).

Ce test nous a fourni des preuves que l'extrait aqueux ainsi que l'extrait éthanolique ont un effet anti-inflammatoire topique dans ce modèle d'inflammation chez la souris. Selon les résultats obtenus, on déduit que l'extrait éthanolique est plus efficace par rapport à l'extrait aqueux, cela peut être parce que la macération a permis d'extraire un maximum de composés bioactifs par rapport à l'extraction par infusion.

III. Évaluation de l'activité intestinale recto-colite

La présente étude consiste à évaluer le pouvoir anti-inflammatoire des graines de *P. halepensis* Mill sur la rectocolite. Elle consiste en l'introduction intra-rectale d'un agent ulcérogène : l'acide acétique CH₃COOH 5%. Les résultats de cette activité obtenus ont été comparés à ceux de dexaméthasone (lot référence) et au lot témoin. L'ulcération intestinale a été provoquée selon la méthode décrite par (Wang et al, 2008) avec quelques modifications.

III.1. Observation macroscopique

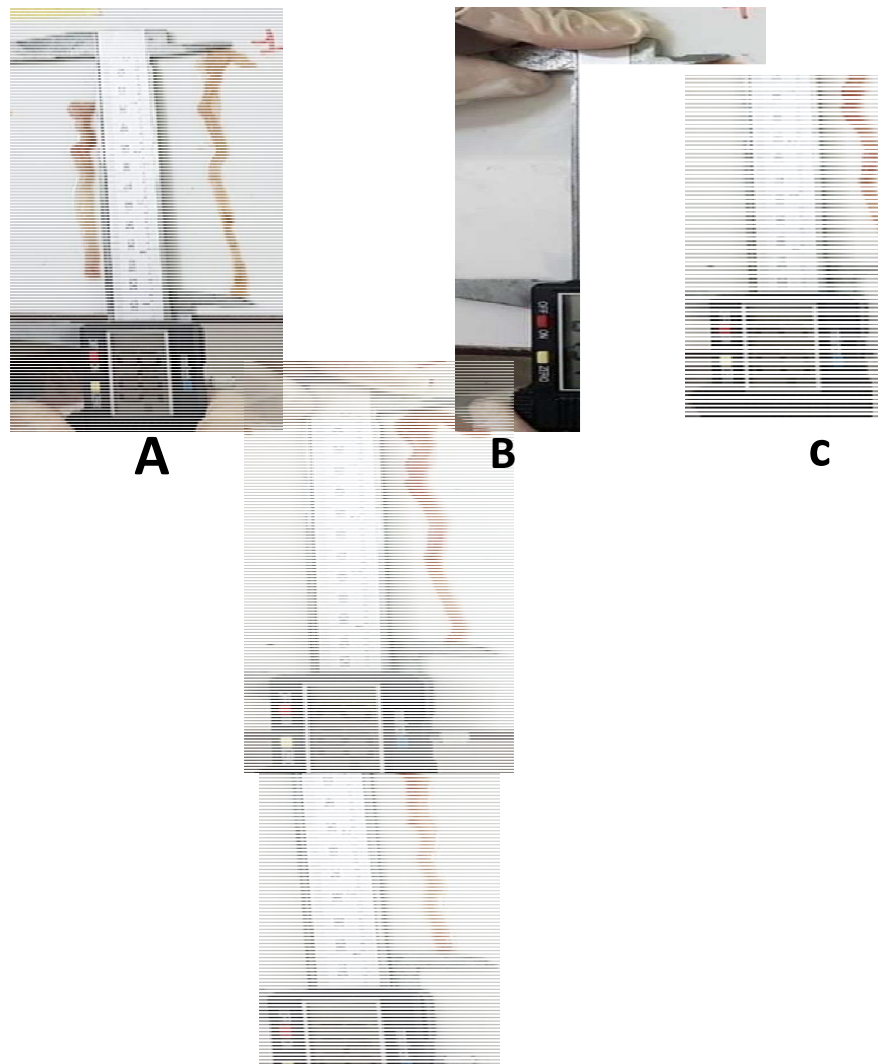


Figure 15: L'aspect macroscopique du colon chez les souris. A : témoin, B : acide acétique, C : référence, D : essai.

D

Les souris recevant l'acide acétique ont montré une colite ulcéreuse caractérisée par des diarrhées, perte du poids et une hémorragie. La longueur du colon a également subi une réduction significative en comparaison avec le témoin.

Le traitement des souris par l'extrait éthanolique pour une période de 7 jours a réduit clairement les dommages causés par la colite ulcéreuse induite par l'acide acétique. Ceci se manifesta par un rétablissement significatif de la longueur du colon devenue presque analogue à celle observée chez le lot témoin et le lot référence.

Le raccourcissement du colon reflète la présence d'œdème à ce niveau. L'extrait éthanolique riche en polyphénols montre un effet protecteur sur ce paramètre donc il y'a eu une prévention du raccourcissement du colon.

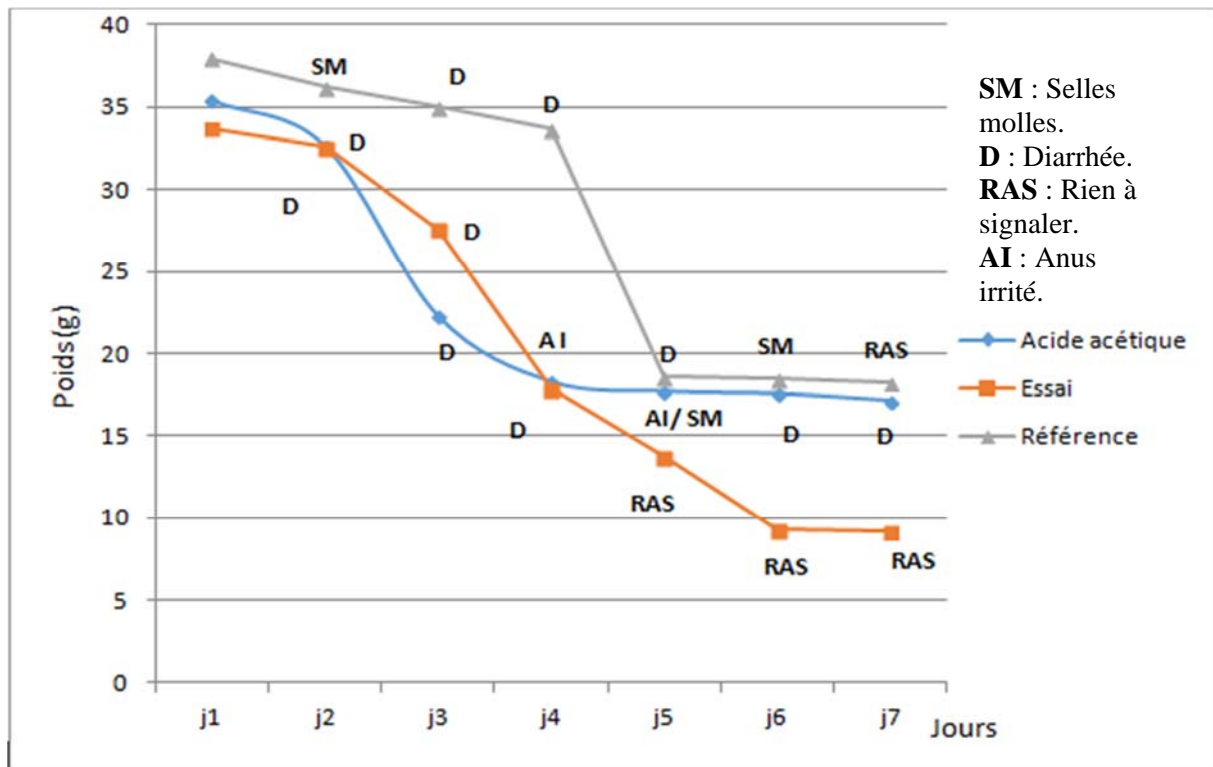


Figure 26 : évaluation du poids et observation des souris de chaque lot en fonction des jours.

Cette figure illustre le changement du poids des souris des différents lots (acide acétique, référence et essai) en fonction des jours (7 jours). Les résultats obtenus révèlent une chute de poids des souris :

- Lot acide acétique : une baisse progressive du poids (du premier jour jusqu'au quatrième) suivie d'une stabilisation a été observé. L'observation quotidienne des symptômes n'a pas montré une amélioration pendant les derniers jours (atteinte par une diarrhée et irritation de l'anus) par rapport au lot référence et lot essai.
- Lot référence : Lot référence : une diminution du poids (1-5 jours) et une amélioration par rapport aux symptômes (rien n'a été signalé pendant le dernier jour)a été observé, contrairement au lot acide acétique.

- Lot essai : un recule important par rapport au poids des souris suivi d'une légère amélioration a été observé (rien n'a été signalé pendant les derniers jours) contrairement au lot référence.

Les résultats obtenus à l'issue du test anti-inflammatoire de la rectocolite montre que l'extrait éthanolique, des graines de *P. halepensis* Mill, améliore de façon remarquable les symptômes causés suite à l'injection de l'acide acétique donc l'extrait a un effet anti-inflammatoire topique dans ce modèle d'inflammation chez la souris.

L'acide acétique agit comme un destructeur de la surface de la muqueuse du côlon sans pour autant atteindre les couches les plus profondes. Il engendre aussi une augmentation des taux des médiateurs inflammatoires et aggrave ainsi l'inflammation (**Thippeswamy et al, 2011**). L'administration de l'acide acétique chez les souris a présenté des symptômes indésirables tels qu'une diarrhée sévère, un saignement et une perte de poids corporel. La diarrhée serait due à l'augmentation de la perméabilité des cellules intestinales ou à l'hyperosmolarité. La perte de poids et le raccourcissement du côlon, qui sont des indicateurs de la gravité de l'inflammation intestinale corrélée avec les changements pathologiques et histologiques.

Les composés des polyphénols peuvent exercer leurs propriétés anti-inflammatoires à des niveaux multiples grâce à leur capacité à moduler l'activité des divers enzymes et l'expression de gènes impliqués les voies de signalisation de l'inflammation. D'autre part, de nombreux polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'intestin grêle et atteignent ainsi le colon. La présence de polyphénols et de leurs produits de dégradation par la flore colique en quantité non négligeable dans le colon pourrait conduire à une action anti-inflammatoire locale. Ainsi les polyphénols pourraient jouer un rôle nutritionnel intéressant dans le contrôle de l'inflammation intestinale (**Boussenna et al, 2016**).

Plusieurs études ont évalué les effets de polyphénols purs ou d'extraits riches en polyphénols sur l'inflammation intestinale que ce soit in vitro ou in vivo et ont montré que ces micronutriments pourraient limiter ou retarder le développement de l'inflammation intestinale. Les polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'intestin grêle et sont

donc présents en quantité relativement importante dans le colon où ils peuvent exercer une action locale protectrice (**Boussenna et al, 2016**).

L'inflammation colique a été évaluée quotidiennement pendant sept jours (**annexe 5**) par le calcul de MIA, indice de l'activité de la maladie qui prend en compte 3 paramètres : consistance des selles, présence du sang dans les selles et la perte du poids. Un score de 0 à 4 est attribué à chaque paramètre selon Cooper et al (**Cooper et al, 1993**) et la moyenne de ces paramètres est calculée pour chaque souris (**tableau XIV**).

Résultats et discussions

Tableau XIV : évaluation quotidienne de l'évolution de l'inflammation selon les scores cliniques.

jours	N° de souris	Score perte de poids			Score hémorragie			Score consistance des selles			Score ulcère, érythème, érosion			IAM		
		A C	R	E	A C	R	E	A C	R	E	A C	R	E	A C	R	E
J1	1	M	0	1		0	0		2	0		2	2		2	1
	2	1	2	1	0	0	0	4	3	0	4	4	4	5	5	1
	3	M	M	1			0			0			2			1
	4	1	1	1	0	0	0	0	4	0	2	4	2	1	5	1
	5	1	1	1	0	0	0	4	2	0	4	2	4	5	3	1
	6	M	M	1			0	0		0			1			1
	7	2	1	1	0	0	0	0	4	0	2	4	2	2	5	1
J2	1	M	1	1		0	0		2	0		2	2	3		1
	2	1	1	1	0	0	0	4	4	4	4	3	4	5	5	5
	3	M	M	1			0			0			2			1
	4	0	1	1	2	0	0	0	4	3	2	4	2	2	5	4
	5	1	2	1	0	0	0	4	2	4	4	2	4	5	4	5
	6	M	M	1			0			0			2			1
	7	1	1	1	0	0	0	0	4	4	2	4	2	1	5	5
J3	1	M	1	1		0	0		0	2		2	2		1	3

Résultats et discussions

	2	1	2	1	0	0	0	4	3	4	4	4	4	5	5	5
	3	M	M	0			0			0			2			0
	4	1	2	1	2	0	0	2	3	0	2	4	2	5	5	
	5	0	1	1	0	0	0	4	4	4	4	2	4	4	5	5
	6	M	M	1			0			4			2			5
	7	1	2	M	0	0		2	3		2	4		3	5	
J4	1	M	1	1		0	0		0	4		2	2		1	5
	2			1			0			4			2			5
	3	M	M	1			0			0			2			1
	4	1		1	0		0	2		3	2		2	3		4
	5			M												
	6	M	M	M												
	7	1		M	4		0			2				5		
J5	1	M	M	1			0			0			2			1
	2			M												
	3	M	M	0			0			0			2			0
	4	1		1	2		0	2		0	2		2	5		1
	5			M												
	6	M	M	M												
	7			M												
J6	1			M												

Résultats et discussions

	2	M				
	3	0	0	0	2	0
	4	1	0	0	2	1
	5	M				
	6	M				
	7	M				
J7	1	M				
	2	M				
	3	0	0	0	2	0
	4	1	0	0	2	0
	5	M				
	6	M				
	7	M				

Avec :

AC : acide acétique.

R : référence.

E : essai

M : mort.

-Lot acide acétique : l'administration de l'acide acétique induit une baisse de poids des souris, cela était observé par le pourcentage de score de perte de poids (1-5% jusqu'au 5-10% dans certains cas), il provoque également des signes cliniques tels que des saignements rectaux, diarrhée dès les premiers jours, une colite ulcéreuse sévère, erythème et érosion. Ainsi l'installation de la maladie (IAM) est présente dès le premier jour pour certaines souris (souris 2 et 5).

-Lot référence : en observant les scores calculés, les symptômes indésirables (perte de poids, diarrhée sévère) étaient remarqués dès les premiers jours. Présence d'ulcères, érythème et érosion dans la plupart des cas. L'installation de la maladie est apparue dès le deuxième jour. Le traitement des souris par le dexaméthasone n'a pas réduit vraiment les dommages causés.

-Lot essai : l'apparition des signes cliniques des colites a progressivement diminué au bout des 7 jours tel que le gain de poids corporel, la consistance des selles est devenue normale et présence légère des ulcères. L'installation de la maladie a disparu au 7^{ème} jour.

En comparaison entre les différents lots le IAM des souris du lot essai présente un score significativement plus faible que ceux du lot référence. On déduit que l'extrait éthanolique a un effet plus efficace par rapport au dexaméthasone.

On a remarqué une amélioration dans le lot référence par rapport à celui d'acide acétique. Les symptômes étaient moins sévères au bout du 7^{ème} jour, ainsi le IAM est faible.

Les substances présentes dans l'extrait comme les polyphénols pourraient jouer un rôle protecteur vis-à-vis de l'inflammation colique.

À partir de nos observations macroscopiques, on peut déduire que les polyphénols peuvent avoir un effet sur l'installation de l'ulcération. L'effet protecteur des polyphénols sur la RCH a été confirmé par de récentes études expérimentales (**Aboura, 2017; Yeganeh et al, 2018**).

L'utilisation des polyphénols dans le traitement des MICIs a été signalée comme un traitement préventif possible par plusieurs études démontrant un retard perceptible dans le développement de la maladie (**Romier-Crouzet et al, 2009**).

III.2. Observation microscopique

L'histologie a pour but l'obtention des coupes fines colorées d'un tissu biologique observable au microscope optique (**Venteo and Velot, 2010**). Dans le but de confirmer les

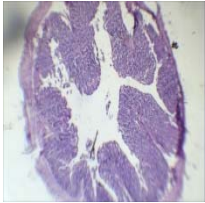
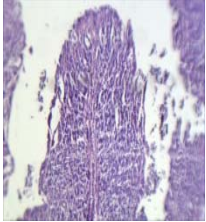
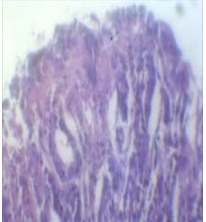

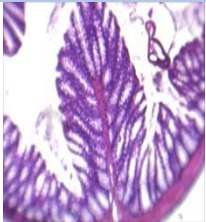


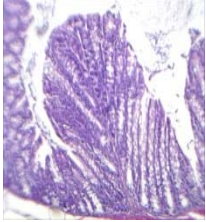
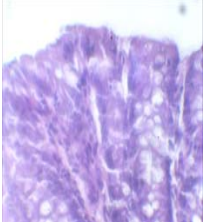
résultats obtenus lors des observations macroscopiques des côlons, une étude histologique réalisée sur les échantillons prélevés a permis de mieux évaluer l'activité anti-rectocolite de l'extrait éthanolique.

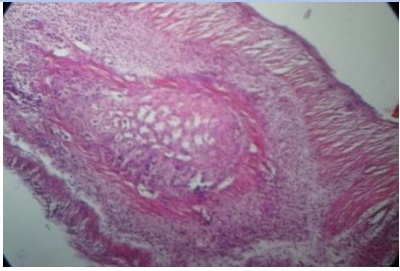
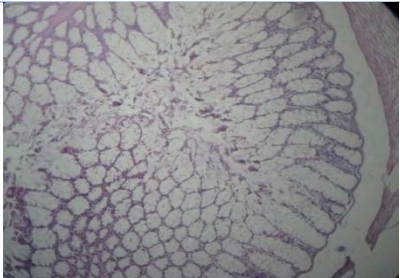
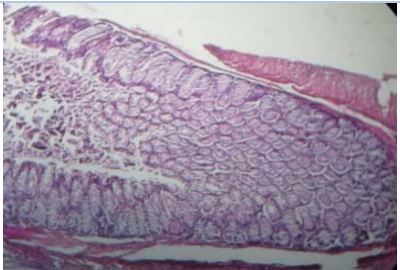
Cette évaluation est basée sur le changement architectural de la muqueuse, l'infiltration des neutrophiles, la destruction des cryptes et la présence d'ulcérations.

Tableau XV : observation des microphotographies de la section histologique du fragment du côlon des souris des différents lots colorés avec Hématoxyline / Eosine.

Résultats et discussions

Tableau XVI : observation des microphotographies de la section histologique du fragment du côlon des souris du lot essai atteint de la rectocolite induite par l'acide acétique, colorée avec Hématoxyline / Eosine.

Essai	Image			Observation
	X4	X10	X40	Observation
Acide acétique				Destruction de l'épithélium, une infiltration des cellules immunitaires au niveau du chorion et de l'œdème au niveau des muqueuse et sous-muqueuses.
Référence				Une seule portion nécrosée. légère régénération de l'épithélium, réduction de l'œdème et des cellules inflammatoires.
Témoin				Colon intact. surface intacte des entérocytes, architecture normale de l'épithélium glandulaire, de la muqueuse et de la sou-muqueuse

Essai 2		Une forte infiltration des cellules immunitaires (réponse immunitaire) donc il y'a une réaction inflammatoire.
Essai 3		légère régénération de l'épithélium de surface et des cryptes réduction de l'œdème et des cellules inflammatoires.
Essai 4		Nécrosé avec présence d'une infiltration légère des lymphocytes.

L'acide acétique entraîne un effet pro-inflammatoire au niveau de la muqueuse colique et a pour conséquence la génération des espèces réactives de l'oxygène qui à leur tour, activent le phénomène de peroxydation lipidique et aboutissent à la destruction de la muqueuse (Thippeswamy et al, 2011).

Une infiltration des cellules immunitaires principalement les neutrophiles a été retrouvée. Cette infiltration est la résultante de la libération des médiateurs de l'inflammation (histamine, sérotonine...) qui activent l'endothélium vasculaire ce qui induit l'augmentation de la capacité adhésive des neutrophiles et facilite leur migration vers le site lésionnel (Stevens et al, 2004).

Le traitement par dexaméthasone a minimisé les dommages coliques. Le tissu a gardé un aspect régulier, semblable à l'aspect normal de la paroi colique retrouvé chez le lot témoin non traité avec l'acide acétique.

L'extrait éthanolique des graines de *P. halepensis* Mill présente un effet préventif vis-à-vis de l'installation de l'ulcération. Cette observation a été confirmée au niveau microscopique où on a observé une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires. L'administration de l'extrait éthanolique riche en polyphénols, après l'induction de colite, a conduit à un abaissement de l'activité de la Myéloperoxydase, ceci peut suggérer l'effet protecteur des polyphénols sur l'infiltration des granulocytes coliques. L'utilisation des polyphénols dans le traitement des MICIs a été signalée comme un traitement préventif possible par plusieurs études démontrant un retard perceptible dans le développement de la maladie (**Romier-Crouzet et al, 2009**).

*Conclusion générale et
perspectives*

Conclusion générale et perspectives

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

L'objectif scientifique de ce projet était d'étudier *in vitro* et *in vivo* l'activité anti-inflammatoire par différentes méthodes des deux extraits aqueux et éthanolique.

Le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes révèle une dissimilitude dans les teneurs des deux extraits examinés. L'extrait éthanolique avait des teneurs plus élevées en phénols totaux que l'extrait aqueux alors que ce dernier avait des teneurs plus élevées en flavonoïdes que l'extrait éthanolique.

L'activité anti-inflammatoire des deux extraits était significative avec des valeurs comparables aux références, ils ont montré un pouvoir inhibiteur de l'inflammation provoquée par l'injection de la carragénine.

Ce travail a permis aussi de mettre en évidence les effets protecteurs de l'extrait des graines de *Pinus halepensis* Mill sur le développement de l'inflammation colique induite par l'acide acétique. Ces effets dépendent de sa composition polyphénoliques de l'extrait et de son mode de préparation.

Ces résultats supportent l'utilisation ethno pharmacologique des graines de *Pinus halepensis* Mill qui ont montré une constitution chimique riche en composés phénoliques.

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

- Identifier les principaux composés responsables de cette activité en effectuant une isolation guidée par celle-ci
- Utiliser d'autres concentrations pour les tests *in vivo* déjà réalisés.
- Poursuivre les études sur l'échelle moléculaire pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces médicaments traditionnelles et les utilisé en médecine moderne par la détermination des mécanismes d'interaction entre les molécules et les cellules cibles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aboura I (2017) Effet anti-inflammatoire et anti obésité des extraits polyphénoliques de feuilles de caroube ”*Ceratonia siliqua*” et cladode de figuier de barbarie ”*Opuntia ficus-indica*”, in *Faculté des Sciences de la Vie Science Gabriel*, universite de Bourgogne Franche-Comté.
- Babar AM, Hahn EJ and Paek KY (2007) Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules* **12**:607-621.
- Bahroun T (1997) substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. Food and agricultural rsearch council. *Reduit Mauritius*.
- Barnes PJ (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science* **94**:557-572.
- Barton M and Yanagisawa M (2008) Endothelin : 20 years from discovery to therapy. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **86**:485-498.
- Belyagoubi N (2011) Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l’Ouest et du Sud-Ouest Algérien, in *Département de Biologie « Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) »* p 109, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. .
- Boizot N and Charpentier JP (2006) Méthode rapide d’évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d’un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l’Inra*:79-82.
- Boros B, Jakabová S, Dörnyei A, Horváth G, Pluhár Z, Kílára F and Felingé A (2019) Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. *Journal of chromatography A* **1217**:7972-7980.
- Boussenna A, Cholet J, Goncalves-Mendes N, Joubert-Zakeyh J, Fraisse D, Vasson MP, Texier O and Felgines C (2016) Polyphenol-rich grape pomace extracts protect against dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Journal of The Science of Food and Agriculture* **96**:1260-1268.
- Bruneton J (1993) Acides phénols, in *Phamacognosie, phytochimie et plantes médicinales* (Doc Te ed).
- Bruneton J (1999) Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation Lavoisier* **3**:286-347.
- Bruneton J (2002) Phytothérapie : les données de l'évaluation (doc te ed).

Références bibliographiques

- Charles NS, Peter AW and Derek WG (2010) Fundamentals of inflammation. *Cambridge University Press*:2-3.
- Chebaibi A, Rhazi Filali A and Zerhouni M (2011) Effet bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum* L.) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* **9**:158.
- Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Lognay G, Blecker C, Deroanne C and Attiaa H (2008) Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halpensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* **21**:162-168.
- Cheikh-Rouhou S, Hentati B, Besbes S, Blecker C, Deroanne C and Attia H (2006) Chemical Composition and Lipid Fraction Characteristics of Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seeds Cultivated in Tunisia. *Food Sei Tech Int* **15**:407-416.
- Cheurfa M and Allem R (2015) Study of hypocholesterolemic activity of Algerian Pistacia lentiscus leaves extracts in vivo *Brazilian journal of pharmacognosy*.
- Colot M (1972) *Notion techniques de pharmacologie générales, Procédure de gésions des documents et des documents et des données*.
- Conde E, Cara C, Moure A, Ruiz E, Castro E and Dominguez H (2009) Antioxidant activity of the phenolic coumpounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry* **33**:67-87.
- Coulibaly AY, Konate K, Youl ENH, Sombie PAED, Kiendrebeogo M, Meda NR, Lamien A, Zeba B and Nacoulma OG (2011) Anti-proliferative effect of Scoparia dulcis L. against bacterial and fungal strains *Int J Biol Chem Sci* **6**:3055-3063.
- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiologyreviews* **12**:564-582.
- Cuvillon P and Viel E (2002) Anti-inflammatoires non stéroïdiens anti-COX-2. Une nouvelle approche thérapeutique de la douleur aiguë ? *Le Courrier de l'algologie*:19-23.
- Davoine F and Lacy P (2014) Eosinophil cytokines, chemokines and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology Molecular Innate Immunity* **5**:1-17.
- Di Rosa M (1972) Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **24**:89-102.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouma D, Stocker P and Vidal N (2006) Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* **97**:654-660.

- Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S and Ju YH (2013) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*:1-7.
- Donatien KH, Martial GS, Reine BNS, Bienvenue C, Bangnan A, Pascal DC, Eugénie AA, Edwige A, Wotto V, Oue S and Domini CK (2009) Biochemical profile and antioxidant activity of *paprika b iglobosa* and *tamarindus indica* fruits acclimated in Benin *international journal of advanced research* **6**:702-711.
- Dorward DA, Lucas CD, Rossi AG, Haslett C and Dhaliwal K (2012) Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology and Therapeutics* **135**:182-199.
- Druzyńska B, Stepnińska A and Wolosiak R (2007) The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Technol Aliment* **6**:27-36.
- Dubois A, Dauguet J, Herard AS, Besret L, Duchesnay E, Frouin V, Hantraye P, Bonvento G and Delzescaux T (2007) Automated three-dimensional analysis of histological and autoradiographic rat brain sections : application to an activation study. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**:1742-1755.
- Farjon A (1996) Biodiversity of Pinus (Pinaceae) in Mexico: speciation and palaeo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* **121**:365-384.
- Feikh (2014) Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en algérie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.
- Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, Zhu W, Sartor RB, Boedeker E, Harpaz N and Pace NR (2004) Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2**:191-202.
- Green RJ (2004) Antioxydant activity of peanut plant tissues, university of North Carolina-USA.
- Haslam E (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products* **59**:67-202.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics* **96**:67-202.
- Iserin P (2001) Identification, Préparations, soins, in *Larousse encyclopédie des plantes médicinales* (2nd ed), Dorling Kindersley Limited, Londres.

- Iwalewa EO, McGaw LJ, Naidoo V and Eloff JN (2007) Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology* **6**.
- Jick H (1994) Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti inflammatory drugs. *The Lancet* **343**:769-772.
- Kadri N, Khettal B, Adjebli A, Cresteil T, Yahiaoui-zaidi R, Barragan-Montero V and Montero JL (2014) Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial Crops and Products* **54**:6-12.
- Kadri N, Khettal B, Aid Y, Kherfellah S, Sobhi W and Barragan-Montero V (2015) Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food Chemistry* **188**:184-192.
- Kähkönen M, Hopia A, Rauha J, Pihlaja K, Kujala T and Heinonen M (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* **47**:62-3954.
- Keys A (1995) Mediterranean diet and public health: personal reflections. *The American Journal of Clinical Nutrition* **61**:1321S–1323S.
- Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriele IA and Voytas DF (1998) Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome research* **8**:464-478.
- Kirkova M, Ivancheva E and Russanov E (1995) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in aspirin-treated rats. *General Pharmacology: The Vascular System* **26**:613-617.
- Klotz C, Barret M, Dhooge M, Oudjit A, Chaussade S, Coriat R and Abitbol V (2015) Rectocolite hémorragique: conduite diagnostique et prise en charge thérapeutique. *La Presse Médicale* **44**:501-149.
- Krief S (2003) Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, in *Muséum national d'histoire naturelle*.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE and Etherton TD (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine* **113**:71-88.
- Leong LP and Shui G (2002) An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry* **76**:69-75.

- Levy I (1969) Carageenan paws oedema in the mouse. *Life science* **8**:601-606.
- Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE and Mullin GE (1996) Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **41**:2078-2086.
- Madhuri V, Darshan SK and Kent LE (2008) Health effects of foods rich in polyphenols, in *Wild-type food in health promotion and disease prevention* (Inc HP ed) pp 393-412, Totowa.
- Maestrea FT, Cortina J, Bautista S and Bellota J (2003) Does *Pinus halepensis* facilitate the establishment of shrubs in Mediterranean semi-arid afforestations? *Forest Ecology and Management* **176**:147-160.
- Male D (2005) Immunologie : aide-mémoire illustré, (Boeck D ed) pp 79-83, Bruxelles.
- Manach C, Mazur A and Scalbert A (2005) Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology* **16**:1-8.
- 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.
- Matricon J, Barnich N and Ardid D (2010) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonsself* **1**:299-309.
- Nahal I (1962) Etude taxonomique, phytogéographique écologique et sylvicole, in *ÉCOLE NATIONALE DES EAUX ET FORETS ET DE LA STATION DE RECHERCHES ET EXPÉRIENCES*.
- Nasri N, Khaldi A, Fady B and Triki S (2005) Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: composition and population profiling. *phytochemistry* **66**:1729-1735.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* **420**:846-852.
- Neyestani T, R, (2008) Polyphenols and immunity, in *Wild-type food in health promotion and disease prevention* (Inc HP ed) pp 413-434, Totowa.
- Perrin LF, Laurent P and Gros P (1987) AINS et immunodépression, risques réels ou innocuité? *Médecine et hygiène* **45**:1816-1818.
- Prabhu V and Guruvayoorappan C (2012) Anti-inflammatory and anti-tumor activity of the marine mangrove *Rhizophora apiculata*. *Journal of Immunotoxicology* **9**:1-10.
- Quezel P and Barbero M (1992) Le pin d'Alep et les espèces voisines: Répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. *forêt méditerranéenne* **13**.

- Rahmouni O, Dubuquoy L, Desreumaux P and Neut C (2016) Microbiote intestinal et développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Médecine Science* **32**:968-973.
- Rankin JA (2004) Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues* **15**:3-17.
- Rhazi N, Oumam M, Hannache H, Sesbou A, Charrier B, Pizzi A and Charrier-El bouhtoury F (2015) Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan Acacia mollissimabark. *Industrial Crops and Products* **70**:245-252.
- Rhen T and Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine* **353**:1711-1723.
- Rhodewald P (2002) A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **40**:158-168.
- Risser A, Donovan D, Heintzman J and Page T (2009) NSAID prescribing precautions. *American family physician* **80**:1317-1318.
- Romier-Crouzet B, Van De Walle J, During A, Joly A, Rousseau C, Henry O, Larondelle Y and Schneider YJ (2009) Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* **47**:1221-1230.
- Rousselet M, Vignaud J, Hofman P and Chatelet P (2005) Inflammation et pathologie, in *Faculté de médecine de la timone*, Marseille.
- Ryan D, Robards K and Lavee S (1999) Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology* **34**:265-274.
- Ryan GB and Majno G (1977) Acute inflammation. A review. *Am J Pathol* **86**:183-276.
- Šarac Z, Jelena S. Matejić, Zorica Z. Stojanović-Radić, Jovana B. Veselinović, M. Džamić A, Srdjan Bojović and Petar D. Marin (2014) Biological activity of Pinus nigra terpenes— Evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in Biology and Medicine*.
- Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**:3875-3883.
- Schorderet M ed (1992) *Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*, paris.
- Scott A, Khan KM, Cook JL and Duronio V (2004) What is "Inflammation" ? Are we ready to move beyond celsus ? . *British journal of sports medicine* **38**:248-249.

- Serhan CN, Ward PA and Gilroy DW (2010) Fundamentals of inflammation. *Cambridge University Press*.
- Singleton VL and Rossi JAj (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Viticult* **16**:85-144.
- Speroni E, Cervellati R, Innocenti G, Costa S, Guerra MC, Dall'Acqua S and Govoni P (2005) Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antioxidant activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile. *Journal of Ethnopharmacology* **98**:117-125.
- Stevens A, Lowe J and Young B (2004) Anatomie pathologique, (Boeck D ed) pp 10-11.
- Stöckigt J, Sheludko Y, Unger M, Gerasimenko I, Warzecha H and Stöckigt D (2002) High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* **697**:85-113.
- Talbi H, Boumaza A, El-mostafa K, Talbi J and Hilali A (2015) Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *JMES* **6**:1111-1117.
- Thippeswamy BS, Mishra B, Veerapur VP and Gupta G (2011) Anxiolytic activity of *Nymphaea alba* Linn. in mice as experimental models of anxiety. *Indian journal of pharmacology* **43**:50-55.
- Tsimogiannis DI and Oreopoulou V (2006) The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **7**:140-146.
- Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L and Hooper LV (2008) Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**:20858-20863.
- Venteo L and Velot E (2010) L'importance de la fixation en histochimie. *Association Française d'Histotechnologie* **23**:25-32.
- Vincken J-P, Heng L, de Groot A and Gruppen H (2006) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **68**:275-297.
- Wang X, Zhao L, Han T, Chen S and Wang J (2008) Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-o-beta-d-glucoside, an active component of *Polygonum*

Références bibliographiques

- multiflorum thunb, on experimental colitis in mice. *European Journal of Pharmacology* **578**:339-348.
- Weill B, Batteux F and Dhainaut J (2003) Immunopathologie et réactions inflammatoires, (Univesité DB ed) pp 12-23, Paris.
- Wu N, Fu K, Fu YJ, Zu YG, Chang FR and Chen YH (2009) Antioxidant Activities of Extracts and Main Components of Pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. Leaves. *molecules* **14**:1032-1043.
- Yeganeh PR, Leahy J, Spahis S, Patey N, Desjardins Y, Roy D, Delvin E, Garofalo C, Leduc-Gaudet J, St-Pierre D, Beaulieu J, Marette A, Gouspillou G and Levy E (2018) Apple peel polyphenols reduce mitochondrial dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **57**:56-66.
- Zarbato M (2010) Intérêt du dosage par microméthode de la Protéine C Réactive au cabinet de pédiatrie in *Faculté de Pharmacie*, université Henri poincaré-Nancy 1.
- Zavala MA and Zea E (2004) Mechanisms maintaining biodiversity in Mediterranean pine-oak forests: insights from a spatial simulation model. *Plant Ecology* **171**:197-207.
- Zenk MH and Jeuenger M (2007) Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry* **68**:2757-2772.

Annexes

Annexe N° 01

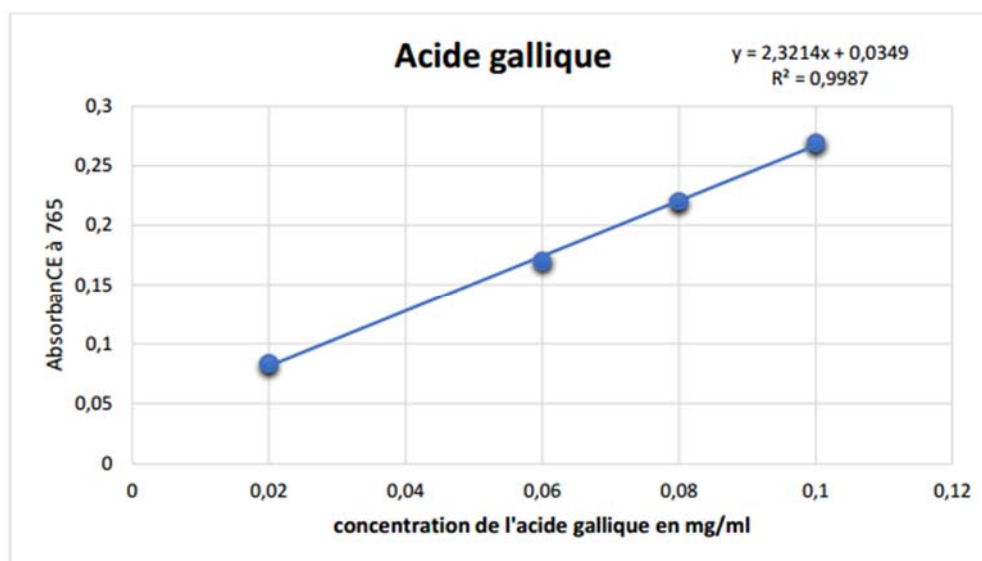


Figure 01 : Courbe d'étalonnage du standard acide gallique utilisé dans le dosage des polyphénols totaux.

Annexe N° 02

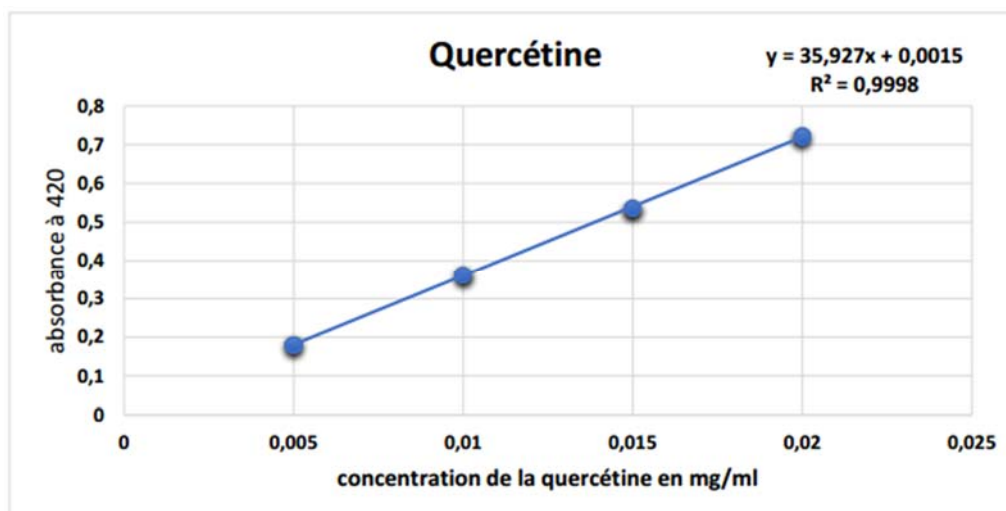


Figure 02 : Courbe d'étalonnage du standard Quercétine utilisé dans le dosage des flavonoïdes.

Annexe N°03

1. Préparation de la solution de carragénine

Pour la préparation de la solution de carragénine, 0,5 g de la carragénine est ajouté progressivement à 25 ml d'eau distillée et ajuster le volume à 50 ml avec d'eau distillée.

2. Préparation de la solution de référence

Pour la préparation de cette solution, un comprimé d'Ibuprofène (400 mg) a été dissout dans 200 ml d'eau physiologique.

Annexe N° 04

Méthode de pieds à coulisse

Extrait aqueux

Tableau I : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot témoin.

souris	poids	T0	1h	2h	3h	4h
S1	24	1,15	1,92	1,74	1,66	1,59
S2	22	1,97	2,21	2,14	2,05	1,65
S3	23	1,27	2	1,71	2,06	1,75
S4	25	1,67	2,78	2,64	2,48	1,91
S5	25	1,50	1,97	1,69	1,62	1,52
Moyenne	/	1,51	2,15	1,98	1,97	1,68

Tableau II : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot référence.

souris	poids	T0	1h (mm)	2h (mm)	3h (mm)	4h (mm)
S1	23	1,61	1,83	1,26	1,24	1,17
S2	28	1,81	2,52	2,01	2,00	1,74
S3	24	1,09	1,75	1,61	1,51	1,43
S4	25	1,95	2,03	1,73	1,52	1,41
S5	25	1,43	1,30	1,58	1,44	1,32
moyenne	/	1,58	1,88	1,64	1,54	1,41

Tableau III: mesure de l'œdème des pattes des souris du lot essai.

souris	poids	initial	1h	2h	3h	4h
S1	24	1,15	1,74	1,66	1,50	1,71
S2	22	1,51	1,63	1,63	1,49	1,39
S3	23	1,27	1,55	1,67	1,40	1,33
S4	25	1,16	1,45	1,34	1,55	1,56
S5	25	1,59	2,03	1,59	1,53	1,50
moyenne	/	1,34	1,68	1,58	1,49	1,50

Extrait éthanolique

Tableau IV : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot témoin.

souris	poids	T0	1h	2h	3h	4h
S1	24	1,15	1,92	1,74	1,66	1,59
S2	22	1,97	2,21	2,14	2,05	1,65
S3	23	1,27	2	1,71	2,06	1,75
S4	25	1,67	2,78	2,64	2,48	1,91
S5	25	1,50	1,97	1,69	1,62	1,52
Moyenne	/	1,51	2,15	1,98	1,97	1,68

Tableau V : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot référence.

souris	poids	T0	1h	2h	3h	4h
S1	23	1,61	1,83	1,26	1,24	1,17
S2	28	1,81	2,52	2,01	2,00	1,74
S3	24	1,09	1,75	1,61	1,51	1,43
S4	25	1,95	2,03	1,73	1,52	1,41
S5	25	1,43	1,30	1,58	1,44	1,32
moyenne	/	1,58	1,88	1,64	1,54	1,41

Tableau VI : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot essai.

souris	poids	initial	1h	2h	3h	4h
S1	21	0,99	1,47	1,59	1,29	0,93
S2	22	1,07	1,74	1,63	1,60	1,47
S3	20	1,33	1,59	1,53	1,47	1,32
S4	22	1,17	1,81	1,62	1,42	1,33
S5	19	1,22	1,23	1,20	1,20	1,20
moyenne	/	1,16	1,57	1,51	1,40	1,25

Méthode de couper les pattes

Extrait aqueux

Tableau VII : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot témoin.

souris	Poids des pattes droites	Poids des pattes gauches
1	0,076	0,115
2	0,062	0,109
3	0,080	0,103
4	0,084	0,125
5	0,068	0,095
moyenne	0,0758	0,109
% d'œdème	47,30	
% de réduction	0%	

Tableau VIII : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot référence.

souris	Poids pattes droites	Poids pattes gauches
1	0,130	0,160
2	0,120	0,160
3	0,125	0,170
4	0,150	0,20
5	0,170	0,155
moyenne	0,133	0,169
% d'œdème	21,58%	
% de réduction	51,31%	

Tableau IX : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot essai.

souris	Pattes gauches	Pattes droites
S1	0,175	0,132
S2	0,129	0,125
S3	0,153	0,124
S4	0,156	0,123
S5	0,138	0,119
Moyenne	0,150	0,125
% d'œdème	20%	
% réduction	57,72%	

Extrait éthanolique

Tableau X : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot témoin.

souris	Poids des pattes droites	Poids des pattes gauches
1	0,076	0,115
2	0,062	0,109
3	0,080	0,103
4	0,084	0,125
5	0,068	0,095
moyenne	0,0758	0,109
% d'œdème	47,30	
% de réduction	0	

Tableau XI : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot référence.

souris	Poids pattes droites	Poids pattes gauches
1	0,130	0,160
2	0,120	0,160
3	0,125	0,170
4	0,150	0,20
5	0,170	0,155
moyenne	0,133	0,169
% d'œdème	21,58	
% de réduction	51,31	

Tableau XII : mesure de l'œdème des pattes des souris du lot essai.

souris	Pattes gauches	Pattes droites
S1	0,137	0,128
S2	0,146	0,141
S3	0,134	0,127
S4	0,136	0,128
S5	0,131	0,138
Moyenne	0,136	0,132
% d'œdème	3,03	
% de réduction	93,59	

Annexes 05 :

Tableau XIII: observation des signes cliniques du lot acide acétique.

<div style="text-align: center;"> Jour Poids (g) </div>	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
S1	36	34 D	M				
S2	38	35 D	34 D	33 D	32 SM	31 D	30 D
S3	30	29 D	28 D	M			
S4	32	31 RAS	31 AI	32 SM, AI	31AI	30 D	29 D
S5	38	34 D	31 D	31 AI	31 SM	31 SM	31 SM
S6	36	33 D	M				
S7	38	33 SM	32 RAS	32 H	30 AI	31 D	30 D
Moyenne	35,43	32,71 D	22,29 D	18,28 AI	17,71 AI/SM	17,57 D	17,14 D

Tableau XIV: observation des signes cliniques du lot essai.

Jour Poids (g)	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
S1	37	34 RAS	34 SM	31 D	30 RAS	M	
S2	33	31 D	31 D	29 D	M		
S3	34	33 (RAS)	32 RAS	32 (RAS)	34 RAS	34 RAS	34 RAS
S4	33	32	34 (RAS)	33 D	32 RAS	31 RAS	30 RAS
S5	35	34 D	31 D	M			
S6	36	34 D	31 D	M			
S7	28	30 D	M				
Moyenne	33,71	32,57 D	27,57 D	17,85 D	13,71 RAS	9,28 RAS	9,14 RAS

Tableau XV: observation des signes cliniques du lot référence

Jour Poids (g)	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
S1	38	38 SM	37 SM	36 AI	34 H	33 SM	31 SM
S2	38	35 SM	32 D	31 D	30 D	28 RAS	28 RAS
S3	38	36 D	35 D	32 SM	M	M	
S4	38	33 D	32 D	32 D	M	M	
S5	38	38 SM	39 D	37AI	34 D	36 SM	37 RAS
S6	36	37 SM	36 D	35 D	M	M	
S7	40	37 D	34 D	33 D	32 AI	32 SM	32 RAS
Moyenne	38	36,28 SM	35 D	33,71 D	18,57 D	18,43 SM	18,29 RAS

Résumé

Le pin d'Alep est une espèce appartenant exclusivement au bassin méditerranéen, il est considéré comme une source importante de composés bioactifs qui possède plusieurs vertus grâce à sa richesse en composés phénoliques. La présente étude a pour objectif d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires des extraits aqueux et éthanolique des graines de *Pinus halepensis* Mill *in vivo*. Les résultats de dosage montrent la richesse d'extrait éthanolique en phénols totaux ($6,55 \pm 0,31$ mg EAG/ g E) par rapport à l'extrait aqueux ($5,77 \pm 0,29$ mg EAG/ g E), contrairement aux flavonoïdes qui est plus riche en extrait aqueux ($0,94 \pm 0,27$ mg EQ/ g E) qu'à celui d'extrait éthanolique ($0,63 \pm 0,03$ mg EQ/ g E). Les résultats obtenus à l'issue du test anti-inflammatoire montre que l'extrait éthanolique est plus efficace que l'extrait aqueux dans l'étude de la méthodes pieds à coulisse dont le pourcentage de réduction est de 80,87 % et 70,53 % respectivement, c'est ce qui est aussi observé dans la méthode couper des pattes dont le pourcentage de réduction est de l'ordre 93,59 % et 57,72 %. Les résultats de l'évaluation de l'activité intestinale rectocolite a révélé que l'extrait éthanolique, des graines de *P. halepensis* Mill, améliore de façon remarquable les symptômes causés suite à l'injection de l'acide acétique chez les souris *in vivo*. A la lumière de ces résultats, nous suggérons l'utilisation de cette plante ou de ces composants dans la prévention de plusieurs pathologies.

Mots clés : *Pinus halepensis* Mill, polyphénols, Activité anti-inflammatoire, rectocolite,.

Abstract

The Aleppo pine is a species belonging exclusively to the Mediterranean basin, it is considered as an important source of bioactive compounds which has several virtues due to its richness in phenolic compounds. The purpose of this study is to evaluate the *in vivo* anti-inflammatory properties of the aqueous and ethanolic extracts of *Pinus halepensis* Mill seeds. The assay results show the richness of ethanolic extract in total phenols (6.55 ± 0.31 mg EAG / g E) compared to the aqueous extract (5.77 ± 0.29 mg EAG / g E), unlike flavonoids which is richer in aqueous extract (0.94 ± 0.27 mg EQ / g E) than in that of ethanolic extract (0.63 ± 0.03 mg EQ / g E). The results obtained at the end of the anti-inflammatory test show that the ethanolic extract is more effective than the aqueous extract in the study of the calipers methods whose reduction percentage is 80.87% and 70, 53% respectively is what is also observed in the method of cutting legs whose percentage reduction is of the order of 93.59% and 57.72%. The evaluation of intestinal rectocolitis shows that the ethanolic extract, from the seeds of *P. halepensis* Mill, remarkably improves symptoms caused by the injection of acetic acid into mice *in vivo*. In light of these results, we suggest the use of this plant or these components in the prevention of several pathologies.

Key words: *Pinus halepensis* Mill, polyphenols, Anti-inflammatory activity, rectocolitis.

ملخص

الصنوبر هو نوع ينتمي حصرياً إلى حوض البحر الأبيض المتوسط ، ويعتبر مصدرًا مهمًا للمركبات النشطة بيولوجياً والتي لها فضائل عديدة بفضل ثرائها في المركبات الفينولية. والغرض من هذه الدراسة هو تقييم الخواص المضادة للالتهابات من المستخلصات المائية والإيثانولية لبذور صنوبر الطحالب في الجسم الحي. تظهر نتائج الاختبار ثراء مقارنة مع المستخلص المائي (5.77 ± 0.29 mg EAG / g E) مقارنة مع المستخلص الإيثانول في مجموع الفينولات (6.55 ± 0.31 ملغم ، على عكس مركبات الفلافونويد التي تكون أكثر ثراءً في المستخلص المائي (0.94 ± 0.27 mg EQ / g E) من مستخلص الإيثانول (0.63 ± 0.03 ملغم مكافئ / جم). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في نهاية الاختبار المضاد للالتهابات أن الخلاصة الإيثانولية أكثر فاعلية من المستخلص المائي في دراسة طرق الفرجار التي تقل النسبة المئوية لها عن 80.87% و 70 ، 53% على التوالي هو ما لوحظ أيضاً في طريقة تقطيع الساقين التي تقل النسبة المئوية لها عن 93.59% و 57.72%. يظهر تقييم التهاب المستقيم المعوي أن مستخلص الإيثانول ، من بذور *P. halepensis* Mill ، يحسن بشكل ملحوظ الأعراض الناجمة عن حقن حمض الخليك في الفئران في الجسم الحي. في ضوء هذه النتائج ، نقترح استخدام هذا النبات أو هذه المكونات في الوقاية من الأمراض.

الكلمات المفتاحية: مطحنة صنوبر صدفية ، بلوفينول ، نشاط مضاد للالتهابات ، التهاب المستقيم