

MINISTRE 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/FSNVST/2023

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

Domaine : SNV. Filière : Sciences biologiques.

Spécialité : Microbiologie Appliquée.

Présenté par :

OUCHENE Fairouz & TAMSAOUETE Ouezna

Thème

***Etude de la flore microbiologique des
graines du *Pinus halepensis*.***

Soutenu le : 04 /07/2023

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
Mme. MEDBOUA Chafiaa	<i>MCB</i>	<i>Univ. De Bouira</i>	<i>Présidente</i>
Mr. KADRI Nabil	<i>Professeur</i>	<i>Univ. De Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
Mme. BACHIRI Taous	<i>MCB</i>	<i>Univ. De Bouira</i>	<i>Co-promotrice</i>
Mme. GUELLAL Drifa	<i>MCA</i>	<i>Univ. De Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2022/2023



Remerciements

A l'issue du cycle de notre mémoire de fin d'étude nous tenons à remercier dieu le tout puissant.

Nos remerciements les plus sincères vont à :

*Monsieur **N. Kadri** notre promoteur et*

*Madame **T. Bachiri** notre Co -promotrice pour leurs conseils précieux et qui nous ont fait l'honneur et le privilège de bien vouloir nous accorder leur temps afin d'encadrer ce projet de fin d'études.*

*Nos vifs remerciements vont aux membres de jury Madame **Medboua** et Madame **Guellal** pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères gratitude envers les ingénieurs des laboratoires en particulier Mme **S. Bahar** pour leur précieuse contribution à ce travail.*

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces

*Je dédie ce travail à **Allah**, le Tout-Puissant, en reconnaissance de Sa miséricorde infinie et de Sa guidance bienveillante.*

À ma tendre mère, dont l'amour inconditionnel, le soutien sans faille et les sacrifices incommensurables ont façonné la personne que je suis devenue.

À mon cher père, dont l'incroyable dévouement et les sacrifices inlassables ont contribué à me conduire jusqu'ici.

*À mon cher frère **Hilal** ainsi qu'à mes sœurs **Faiza, Souad, Houda, Ahlam, Thiziri** et **Liza**. Leur présence constante, leur soutien indéfectible et leurs encouragements sans limite ont été les moteurs qui m'ont propulsée vers de nouveaux horizons.*

*À **M.K***

*À mes chères cousines **Djoudja** et **Ikram**, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mon amour.*

*Je dédie ce travail à ma binôme **Fairouz** nous avons travaillé main dans la main, surmonté les défis ensemble et partagé des moments précieux de réussite.*

*À tous mes amis **Lahna, Lili, Tina, Yamina, Ouerda** et **Ouidad** qui ont eu la merveilleuse chance de croiser ma route. Votre amitié a été un cadeau précieux dans ma vie.*

À toute ma famille.

Enfin, à la petite moi, je dédie ce travail en reconnaissant ma propre croissance, mes réalisations et mon cheminement personnel. C'est une célébration de ma propre persévérance et de ma détermination à devenir la meilleure version de moi-même.

Ouezna



Dédicaces

Je dédie ce travail :

*A mon défunt grand-père, **AZI ALI**, qui, de là où il est, doit être extrêmement fier de cet accomplissement.*

*A ma grand-mère **Khadidja**, qui m'a toujours tout sacrifié pour moi, et m'a appris à être la personne que je suis aujourd'hui ; je t'aime.*

A mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur soutien constant et leur encouragement tout au long de ce parcours. Leur présence et leurs encouragements ont été mes plus grandes sources de motivation ; je vous aime.

*A ma chère sœur **Soumia** et mon frère **Ayoub** votre présence à mes côtés a été une vraie source d'énergie et de joie.*

*A mes oncles **Fares** et **Adel**, qui m'ont soutenue et conseillée depuis ma tendre enfance.*

*Mes cousins (e) **Sara, Assia, Nour, Maria, Oussama, Younes** et mes chères aunties pour votre présence à mes côtés.*

*A **Ouezna**, mon binôme, Ensemble, nous avons relevé des défis, surmonté des obstacles et accompli des réalisations incroyables.*

Fairouz

Table des Matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION1

Chapitre I. Généralités sur *Pinus halepensis*

I.1. Répartition géographique de pin d'Alep 4

I.1.1. Dans le monde 4

I.1.2. En Algérie 4

I.2. Caractère botanique du pin d'Alep 5

I.3. Exigences écologiques de l'espèce 6

I.4. Phénologie de l'espèce 7

I.5. Régénération du Pin d'Alep 7

I.6. Composition chimique 7

I.7. Les propriétés thérapeutiques et usage traditionnel 8

I.8. Les propriétés pharmacologiques de *Pinus halepensis* 8

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1. Objectif de l'étude 11

II.2. Echantillonnage 11

II.3. Isolement et identification des microorganismes 12

II.4. Mise en évidence de l'activité enzymatique 14

II.4.1. La recherche de l'activité protéolytique (hydrolyse des protéines) 14

II.4.2. La recherche de l'activité amylolytique (hydrolyse de l'amidon) 14

II.4.3. La recherche de l'activité cellulolytique (Hydrolyse de la cellulase) 14

II.4.4. La recherche de l'activité pectinolytique (Hydrolyse de la pectine) 15

Chapitre III. Résultats

III.1. Souches bactériennes.....	18
III.2. Identification bactérienne.....	19
III.3. Résultats des activités enzymatiques.....	20

Chapitre IV. Discussion générale

IV. Discussion générale.....	24
Conclusion.....	29

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

BN : Bouillon nutritif.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

ED : Eau distillée.

EMB : Eosine Methylene Blue.

EP : Eau peptonée.

M : Unité Molaire.

MO : Micro-organismes.

OMS : L'organisation mondiale de la santé.

TSI : Triple Sugar Iron.

Tableau I: Taxonomie du pin d'Alep selon Ozenda [10].	3
Tableau II: Répartition des échantillons par régions dans la wilaya de Bouira.....	18
TableauIII: Répartition des souches bactériennes isolées pour chaque milieu.....	18

Figure 1: Répartition de pin d'Alep dans la région méditerranéenne [8].....	4
Figure 2: Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie [13].....	5
Figure 3: Schéma représentatif des différentes parties de pin d'Alep [14].....	6
Figure 4: Diagramme circulaire illustrant la composition chimique des graines de <i>Pinus halepensis</i> [8].	8
Figure 5: Carte des lieux de récolte des cônes de <i>Pinus halepensis</i> au niveau de la wilaya de Bouira.	11
Figure 6: Photo illustrant les cônes de <i>Pinus halepensis</i> récoltés.	12
Figure 7: Schéma récapitulatif des étapes d'isolement à partir des graines.....	13
Figure 8: Schéma récapitulatif des étapes de la mise en évidence des activités enzymatiques.	16
Figure 9: Taux de souches bactériennes sur chaque milieux (MacConkey, EMB, Chapman)..	19
Figure 10: Pourcentage de souches à Gram -positif et Gram- négatif.....	19
Figure 11: Taux de souches bactériennes isolées des graines de <i>Pinus halepensis</i>	20
Figure 12: Résultat de l'activité protéolytique.....	20
Figure 13: Résultat de l'activité amylolytique.....	20
Figure 14: Résultat de l'activité pectinolytique.....	21
Figure 15: Résultat de l'activité cellulolytique.....	21
Figure 16: La production des enzymes par les graines de <i>Pinus halepensis</i>	22

INTRODUCTION

Les métabolites secondaires des plantes médicinales offrent de nouvelles molécules prometteuses dans la recherche de traitements pour diverses infections, ce qui en fait une source d'intérêt [1].

Le genre *Pinus* regroupe environ 800 espèces à travers le globe, principalement présentes dans l'hémisphère nord. On les trouve notamment en Afrique du Nord (Maroc, Tunisie, Algérie, Libye) et au Moyen-Orient (Liban, Syrie, Palestine, Turquie, Jordanie) [2], [3].

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est l'une des espèces forestières les plus répandues dans le bassin méditerranéen. Il couvre une superficie de 25 000 km² et prédomine dans les zones semi-arides et les régions sèches. L'espèce *P. halepensis* Mill. est largement utilisée dans les projets de reboisement, en particulier en Algérie et en Tunisie. Elle est considérée comme l'un des massifs les plus importants en raison de sa remarquable résistance à la sécheresse [4].

En Algérie, quatre espèces forestières dominent : *P. halepensis* Mill. et *P. pinaster* sont présents naturellement, tandis que *P. pinea* et *P. canariensis* ont été principalement introduits au début du 20ème siècle, sans que l'origine exacte des graines ne soit connue. Ces espèces ont été utilisées pour le reboisement et la revitalisation des zones forestières perturbées [4].

Dans la nature, toutes les plantes sont associées à une diversité de microorganismes qui jouent un rôle crucial dans leur croissance et leur développement. Par exemple, plusieurs travaux ont été rapportés par Midha et ses collaborateurs en 2016 [5] sur la microflore trouvée au niveau des graines de riz, appartenant à trois principaux phyla bactériens : Proteobacteria, Firmicutes et Actinobacteria.

Par contre aucune étude n'a rapporté la diversité microbienne de *Pinus halepensis*. Pour cela nous nous sommes intéressés à la caractérisation de cette microflore en suivant la démarche expérimentale suivante :

- ✚ Isolement et identification des souches bactériennes à partir des graines de *Pinus halepensis*.
- ✚ Screening de souches de *Pinus halepensis* productrices de plusieurs enzymes (protéase, pectinase, cellulase, amylase).

Chapitre I :
Revue de littératures

Le pin d'Alep, scientifiquement connu sous le nom de *Pinus halepensis* Mill. est une espèce appartenant au genre *Pinus*, de la famille des pinacées. Son nom dérive du mot "pit", qui signifie résine en indo-européen [6]. Il est naturellement distribué dans la région méditerranéenne, couvrant plus de 3,5 millions d'hectares et dominant les forêts de la région [7].

Le pin d'Alep est un grand arbre qui peut atteindre une hauteur de 6 à 20 mètres [7]. Il est classé dans le groupe des pins durs (pin diploxyton), qui produit les graines de pin les plus commercialisées au monde. Les grands cônes de l'arbre renferment ces graines, qui sont très nutritives et appréciées par les consommateurs [8].

Cette espèce thermophile est capable de survivre et de prospérer dans divers environnements. Elle se reproduit pendant deux saisons, à l'automne et au printemps [9].

Sur le plan taxonomique, le pin d'Alep est classé comme suit selon la classification d'Ozenda [10]:

Tableau I: Taxonomie du pin d'Alep selon Ozenda [10].

<i>Règne</i>	<i>Plantae</i>
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Pinaceae
Sous-famille	Pinoideae
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis</i> Mill.

Le pin d'Alep est connu sous différentes appellations [10] :

- En français, il est appelé Pin blanc, Pin d'Alep ou Pin de Jérusalem.
- En arabe, il est connu sous le nom de Sanawbar el halabi.
- En espagnol, on le nomme Pi blanc, Pi bord, Pincarrasco ou Pinoblanquillo.
- En italien, il est appelé Pino di Aleppo.

- En berbère, Azenba ou Zgigo.

I.1. Répartition géographique de pin d'Alep

I.1.1. Dans le monde

Le pin d'Alep, à l'exception de l'Égypte, a une aire de répartition naturelle englobant le bassin méditerranéen. Son foyer principal se trouve dans le bassin méditerranéen occidental, en Afrique du Nord, notamment en Algérie, en Tunisie, au Maroc et en Libye [11]. Cette espèce d'arbre se trouve également au Moyen-Orient (Syrie, Liban, Jordanie, Palestine et Turquie), ainsi que dans les régions méditerranéennes du sud de l'Europe, incluant l'est de l'Espagne, l'est de la France, le nord de l'Italie, la Croatie et la Grèce orientale [2].



Figure 1: Répartition de pin d'Alep dans la région méditerranéenne [8].

I.1.2. En Algérie

Le pin d'Alep est largement répandu dans les forêts algériennes, représentant environ 35% de la superficie forestière. Il est présent dans toutes les variantes bioclimatiques, mais domine principalement dans les régions semi-arides [12]. Les principales aires de répartition comprennent la région de Tébessa, le plateau de Constantine et les Aurès, et les forêts de Médéa, du mont Biban, du mont Saida, de Mascara, de Sidi Bel Abbes et de Telagh. De plus, il pousse dans la région de l'Atlas saharien et la région de Djelfa, en particulier dans les montagnes d'Oulad Nail [13].

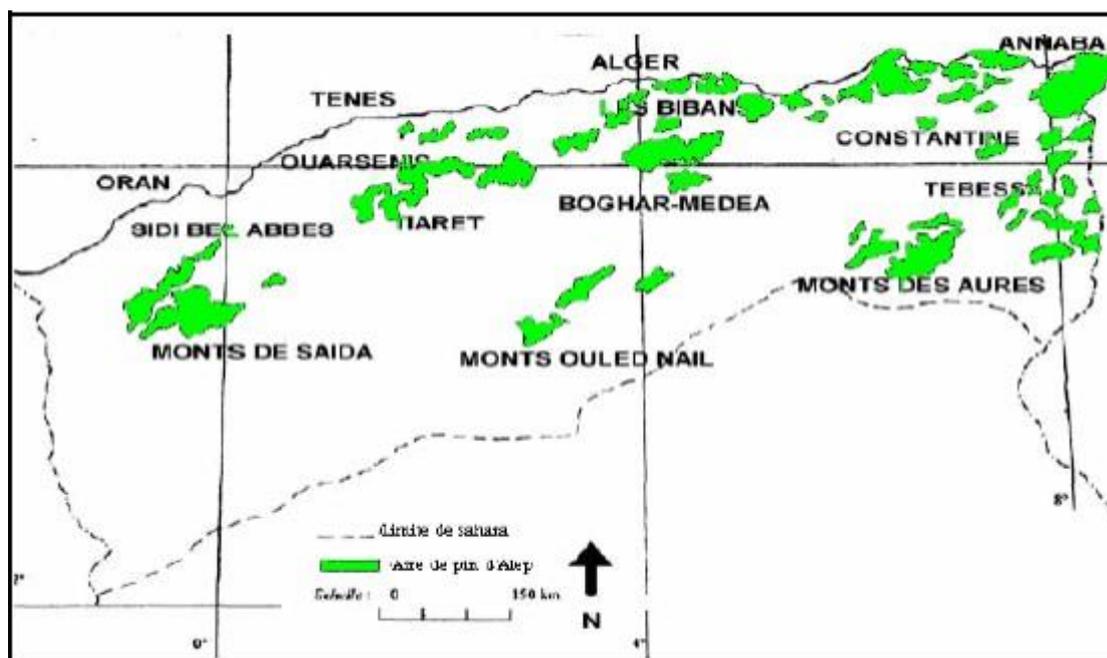


Figure 2: Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie [13].

I.2. Caractère botanique du pin d'Alep

Le pin d'Alep est un arbre à feuilles persistantes qui peut atteindre environ 20 mètres de hauteur. Son tronc présente une forme sinueuse, et son écorce évolue avec le temps, passant d'une texture lisse et grise à une texture plus épaisse, fissurée et brun rougeâtre.

Les jeunes arbres ont une forme régulière, tandis que les arbres plus âgés ont une cime diffuse et irrégulière, souvent dépourvue de branches à la base. Les aiguilles du pin d'Alep sont fines, flexibles et poussent par paires. Elles mesurent entre 5 et 10 cm de longueur et ont une couleur jaune-vert.

Ce qui distingue cette espèce est que les fleurs mâles et femelles se développent sur le même individu (plantes monoïques) et se regroupent en épis. Les cônes de pin d'Alep se forment en verticilles sur les arbres adultes à l'automne. Ils sont composés de nombreuses écailles qui s'ouvrent à maturité, libérant des graines sombres d'environ 7 mm de diamètre. Ces graines sont pourvues d'une aile persistante environ quatre fois plus grande, ce qui facilite leur dispersion rapide [14].

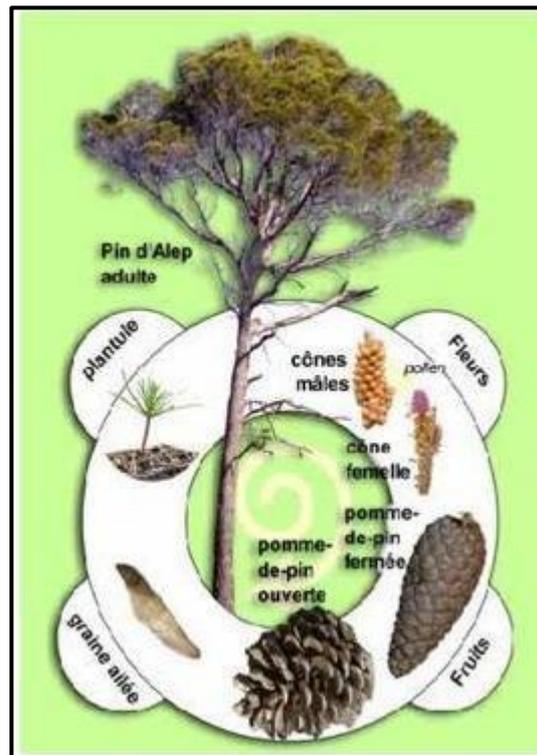


Figure 3: Schéma représentatif des différentes parties de pin d'Alep [14].

I.3. Exigences écologiques de l'espèce

Le pin d'Alep, dont la répartition géographique englobe les étages bioclimatiques méditerranéens, est principalement une essence de l'étage semi-aride. Il présente des exigences climatiques spécifiques, étant héliophile et xérophile, capable de supporter de forts éclaircements et de résister à de longues périodes de sécheresse. Il prospère dans des températures moyennes annuelles allant de 11 à 19 °C, avec une tolérance à des températures exceptionnellement basses allant jusqu'à -15 à -18 °C pendant de courtes périodes [15]. En ce qui concerne les précipitations, le pin d'Alep a généralement besoin de 350 à 700 mm de pluie annuelle, mais peut tolérer des précipitations allant de 200 à 1500 mm [16].

En termes d'exigences édaphiques, cette espèce s'adapte à différents types de sols, mais préfère les sols légers et peu développés, souvent calcaires ou superficiels, sans eau stagnante et avec des teneurs en nutriments modérées à faibles. Elle est hautement résistante à la sécheresse et évite les sols profonds, qui sont généralement plus riches en eau. Les études montrent que les sols calcaires et superficiels, caractérisés par une faible teneur en matière organique et une disponibilité modérée de l'eau et des nutriments, offrent les conditions optimales pour sa croissance en France [17].

I.4. Phénologie de l'espèce

Le pin d'Alep présente une croissance en hauteur de sa pousse terminale, qui se produit par la formation d'un bourgeon terminal en automne, donnant naissance à une nouvelle pousse au printemps suivant [18]. Les cônes de pin d'Alep atteignent leur maturité pendant la deuxième année et libèrent leurs graines au cours de la troisième année. Sous l'effet de fortes chaleurs, les écailles des cônes s'ouvrent naturellement, permettant la dispersion des graines entre la fin du mois d'août et la fin du mois d'octobre. Les graines germent à la fin de l'automne ou au début du printemps. Bien que le pin d'Alep commence à produire des fruits à l'âge de 10 à 12 ans, les graines ne sont aptes à germer qu'à partir de l'âge de 18 à 20 ans [19].

I.5. Régénération du Pin d'Alep

Le pin d'Alep possède une capacité de régénération naturelle grâce à la production de cônes par les arbres matures. Cependant, ce processus est fortement dépendant de l'environnement, avec une germination limitée des graines et un faible taux de survie des jeunes plants. Dans les peuplements matures, l'établissement de jeunes plants est rare, nécessitant des perturbations naturelles telles que les incendies, les vents forts ou les coupes sanitaires pour déclencher la régénération [20].

Le manque de régénération est préoccupant car il entraîne le vieillissement des peuplements et un déficit de régénération en sous-étage. Les graines des cônes du pin d'Alep nécessitent des températures élevées, comme celles des incendies de forêt, pour germer rapidement et coloniser les zones brûlées. Ainsi, des programmes de régénération assistée sont mis en place pour augmenter le nombre de plantes dans les paysages dégradés [21]. Cependant, les activités humaines représentent une menace significative pour une régénération réussie. Par conséquent, la conservation et la gestion des écosystèmes sont indispensables pour protéger le pin d'Alep et les écosystèmes qui en dépendent [20].

I.6. Composition chimique

Les graines de pin sont riches en divers composants tels que des lipides, des protéines, des sucres et des composés phénoliques, ce qui les rend précieuses pour leurs utilisations médicinales. Leur composition varie d'une espèce à l'autre en fonction des conditions géographiques et climatiques (**Figure 4**). Ces résultats soulignent le potentiel des graines de pin

en tant que source de nutriments bénéfiques pour la santé, bien que les valeurs spécifiques puissent varier selon l'espèce de pin et les conditions environnementales [8].

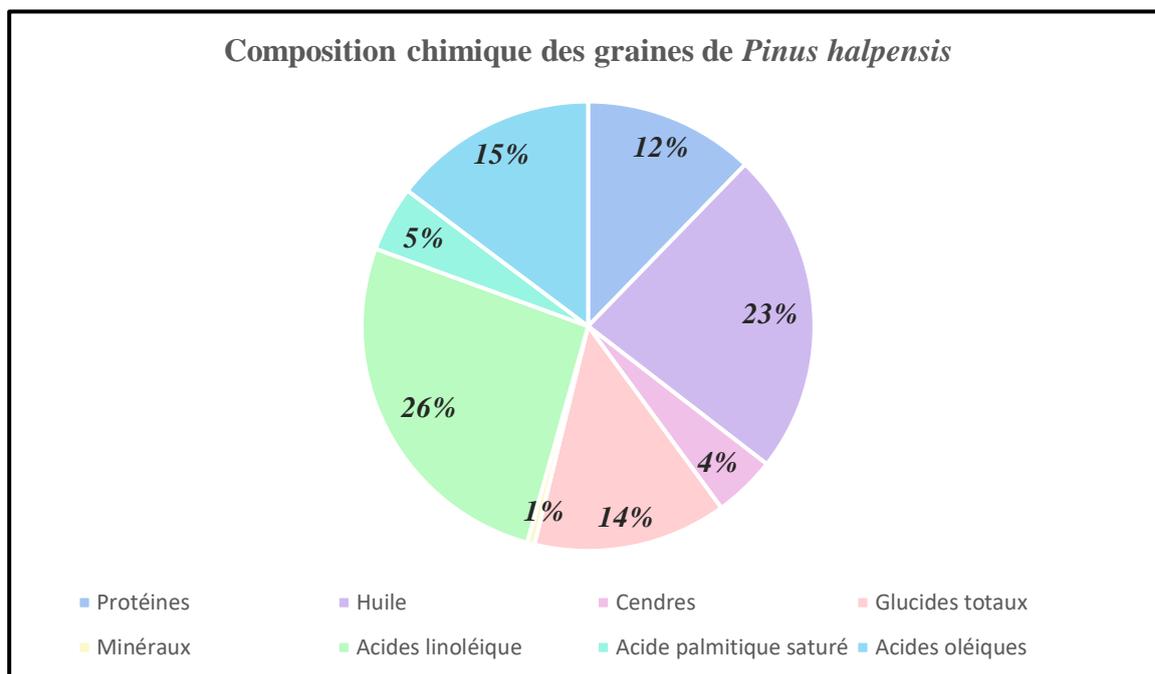


Figure 4: Diagramme circulaire illustrant la composition chimique des graines de *Pinus halepensis* [8].

I.7. Les propriétés thérapeutiques et usage traditionnel

Les branches du *Pinus halepensis* renferment une huile essentielle riche en pinène, qui présente des propriétés thérapeutiques. Elle est reconnue comme un antiseptique puissant pour les affections respiratoires et possède des vertus dépuratives, balsamiques et amères [22]. L'huile de pin est couramment utilisée en aromathérapie pour les massages cutanés, pour soulager les problèmes gastro-intestinaux, ainsi que dans le traitement des maladies cardiovasculaires et de la leishmaniose [23]. Les décoctions de bourgeons, d'écorce et de cônes sont employées pour atténuer les symptômes de l'asthme, de la bronchite et de la toux [24]. Selon la tradition kabyle, une combinaison de résine de pin et de miel peut être utilisée pour traiter la bronchite [25].

I.8. Les propriétés pharmacologiques de *Pinus halepensis*

L'huile essentielle de *Pinus halepensis* présente une activité antibactérienne notable. Des études ont démontré son effet inhibiteur sur différentes souches de microorganismes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Proteus mirabilis*, grâce à sa richesse en β -caryophyllène [23]. Cependant, certaines bactéries à Gram- négatif peuvent être plus résistantes en raison de la présence d'une membrane externe entourant leur paroi cellulaire [21]. Par ailleurs, cette huile essentielle montre également une activité antifongique, inhibant la

croissance de divers champignons tels que *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger*, *Fusarium oxysporum* et *Rhizopus stolonifer* [26]. De plus, l'essence de térébenthine extraite de la gemme des pins présente un pouvoir antifongique contre des micro-organismes pathogènes grâce à sa richesse en pinènes [27].

En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'huile essentielle de *Pinus halepensis* a démontré une grande efficacité dans la neutralisation des radicaux libres et la protection de l'ADN contre la dégradation oxydative [28-29]. Elle présente également des propriétés anti-inflammatoires, réduisant l'inflammation cutanée et ayant des effets anti-œdémateux [30]. L'extrait aqueux de l'écorce de *Pinus halepensis*, riche en polyphénols, est responsable de ces activités antioxydantes et anti-inflammatoires [29].

D'autres études ont démontré que l'huile essentielle de *Pinus halepensis* présente une activité anti-cancéreuse [31], anti-angiogénique [7], hépato et néphroprotectrice [32], neuroprotectrice [33], insecticide et répulsive [34], ainsi qu'une activité herbicide [35].

Chapitre II :
Matériel & Méthodes

II.1. Objectif de l'étude

Notre étude a pour objectif principal de caractériser la microflore bactérienne présente dans les graines de *Pinus halepensis*, en utilisant des méthodes d'isolement et d'identification microbiologique conventionnelle ainsi que le screening de certaines protéines fonctionnelles produites par cette microflore.

Notre travail a été mené au laboratoire de microbiologie SNVST de l'Université de Bouira, de Avril à Juin 2023.

II.2. Echantillonnage

Un total de 20 échantillons de cônes de *Pinus halepensis* ont été récoltés dans les forêts de la wilaya de Bouira, notamment « Zbarbar Lakhdaria », « Bouaklane à Takerboust », « Haizar », « Tikjeda à El Asnam », « Errich à Bouira » comme illustré dans la carte géographique ci-dessous (**Figure 5**) en plus des « Graines achetées ».

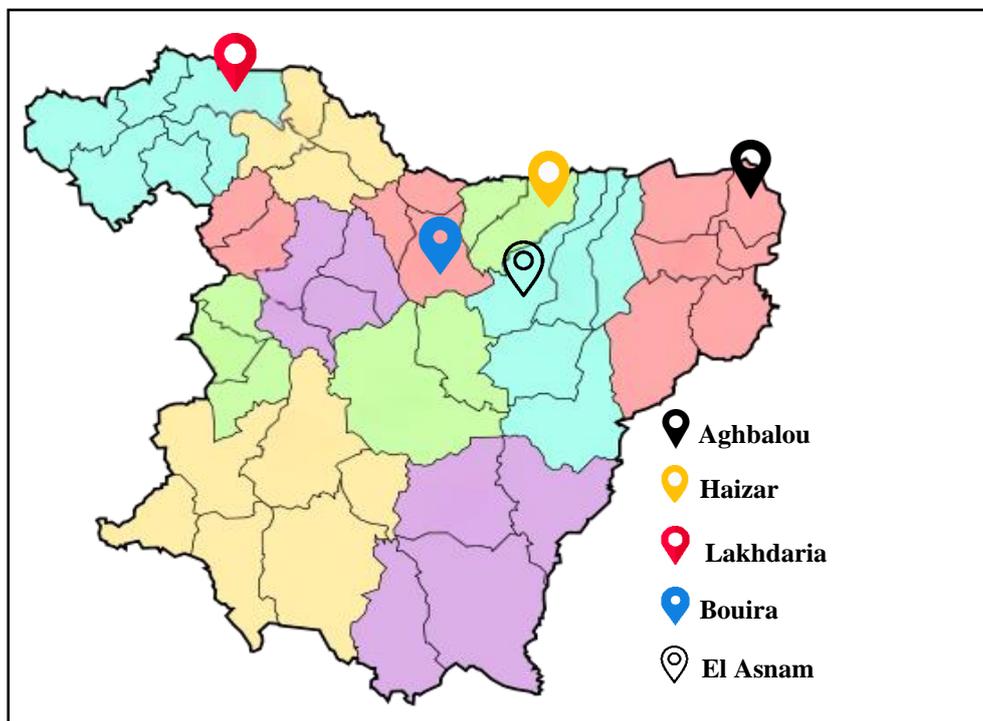


Figure 5: Carte des lieux de récolte des cônes de *Pinus halepensis* au niveau de la wilaya de Bouira.

Dans le but de préserver l'intégrité de la microflore, nous avons opté pour une méthode d'ouverture mécanique des cônes de *Pinus halepensis* à l'aide d'une pince stérile, évitant ainsi l'utilisation de procédés thermiques susceptibles d'altérer la microflore (**Figure 6**).



Figure 6: Photo illustrant les cônes de *Pinus halepensis* récoltés.

II.3. Isolement et identification des microorganismes

Selon le protocole développé par Benkada, 1994, les graines ont été prélevées de manière aseptique. Elles ont subi une désinfection en étant exposées à de l'eau de Javel à une concentration de 10% pendant 2 minutes (**Annexe 01**), suivie de deux rinçages à l'eau distillée pour éliminer toute trace de solution désinfectante. Les graines ont ensuite été soigneusement séchées à l'aide de papier Whatman stérile [36].

Après la désinfection, les graines ont été réparties dans trois milieux différents : 1 g dans 9 ml de bouillon nutritif, 1 g dans 9 ml d'eau peptonée stérile [37], et 2 g dans 5 ml d'eau distillée stérile [38]. Chaque échantillon a été agité pendant 5 minutes à l'aide d'un vortex [39]. Les tubes contenant le BN et l'EP ont été incubés à une température de 37°C pendant environ 18 à 24 heures. Tandis que le troisième tube contenant l'ED stérile a été placé dans un réfrigérateur à une température de 5°C pendant 24 h (**Figure 7**).

Après l'incubation des échantillons et l'ensemencement en quadrants sur des boîtes de gélose nutritive, des repiquages successifs sur des milieux sélectifs tels que MacConkey, EMB et Chapman pour purifier les cultures ont été réalisés. En parallèle, nous avons effectué une observation macroscopique des caractéristiques morphologiques variées des colonies développées sur ces milieux. Cette observation nous a permis d'analyser des critères tels que la taille, la forme, la couleur et la texture des colonies.

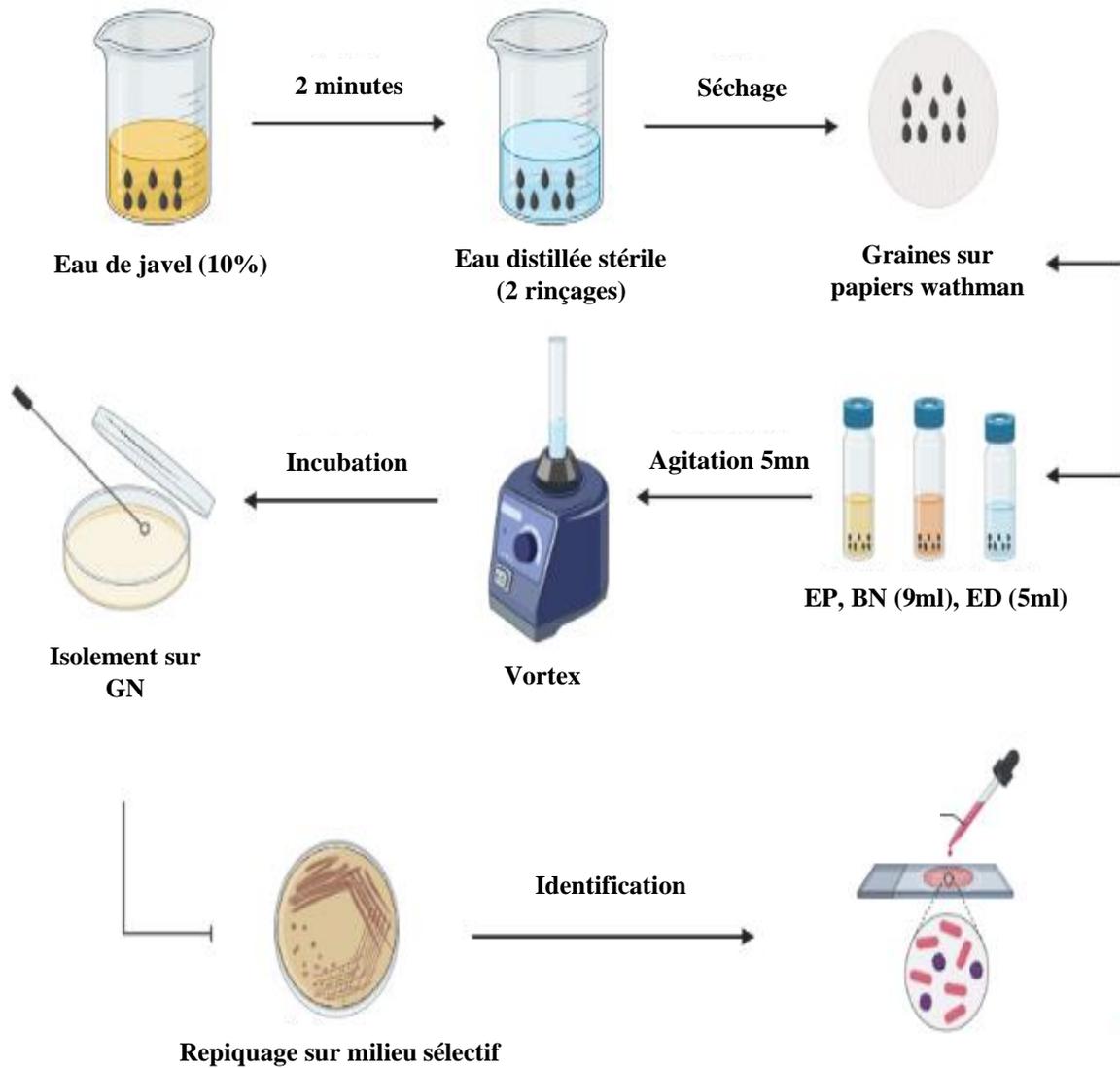


Figure 7: Schéma récapitulatif des étapes d'isolement à partir des graines.

L'identification des souches obtenues a été réalisée en effectuant une galerie biochimique comprenant les milieux Mannitol mobilité, TSI (Triple Sugar Iron) et Citrate de Simmons. De plus, des colorations de Gram ont été réalisées en tant que tests complémentaires.

II.4. Mise en évidence de l'activité enzymatique

II.4.1. La recherche de l'activité protéolytique (hydrolyse des protéines)

Afin de mettre en évidence l'activité protéolytique, nous avons utilisé un milieu gélosé contenant une concentration de 5% de lait écrémé (**Annexe 03**). Ensuite, nous avons inoculé la suspension bactérienne par touche, et incubé à 37°C pendant 48h. Après incubation, La présence d'une zone claire et transparente autour de la culture bactérienne indique la présence d'une activité protéolytique [**39-40**].

II.4.2. La recherche de l'activité amylolytique (hydrolyse de l'amidon)

Afin de mettre en évidence l'activité amylolytique, nous avons utilisé une gélose nutritif contenant 1% d'amidon soluble (**Annexe 03**). Ensuite, nous avons inoculé la suspension bactérienne par touche, et incubé à 37°C pendant 48h. Après l'incubation, nous avons effectué une révélation de l'activité amylolytique en recouvrant le milieu gélosé d'une solution de Lugol pendant 30 secondes, suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. La présence d'une activité amylolytique se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour des colonies bactériennes [**40**].

II.4.3. La recherche de l'activité cellulolytique (Hydrolyse de la cellulase)

Afin de mettre en évidence l'activité cellulolytique, nous avons préparé un milieu de base auquel nous avons ajouté 0,5% (p/v) de cellobiose (**Annexe 03**). Ensuite, nous avons inoculé la suspension bactérienne par touche et incubé à 37°C pendant 48 heures. Après l'incubation, nous avons rempli les boîtes de Pétri avec une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v) (**Annexe 04**) et les avons placées à 37°C pendant 15 à 30 minutes. Par la suite, nous avons effectué un lavage des boîtes avec une solution de NaCl à 1M pendant 5 à 10 minutes à température ambiante (**Annexe 01**). L'activité cellulase produite par les souches bactériennes se manifeste par l'apparition de zones claires autour des colonies bactériennes [**41**].

II.4.4. La recherche de l'activité pectinolytique (Hydrolyse de la pectine)

Afin de mettre en évidence l'activité pectinolytique, nous avons utilisé le milieu d'Agar Pectine (**Annexe 03**). Ensuite, nous avons inoculé la suspension bactérienne par touche et incubé à 37°C pendant 48 heures. Après l'incubation, nous avons inondé les boîtes avec une solution d'Acétate de cuivre à 75% pendant 10 minutes (**Annexe 04**). Un résultat positif est caractérisé par la présence d'un halo clair bien défini autour des colonies bactériennes [**42-43**]. (**Figure 8**).

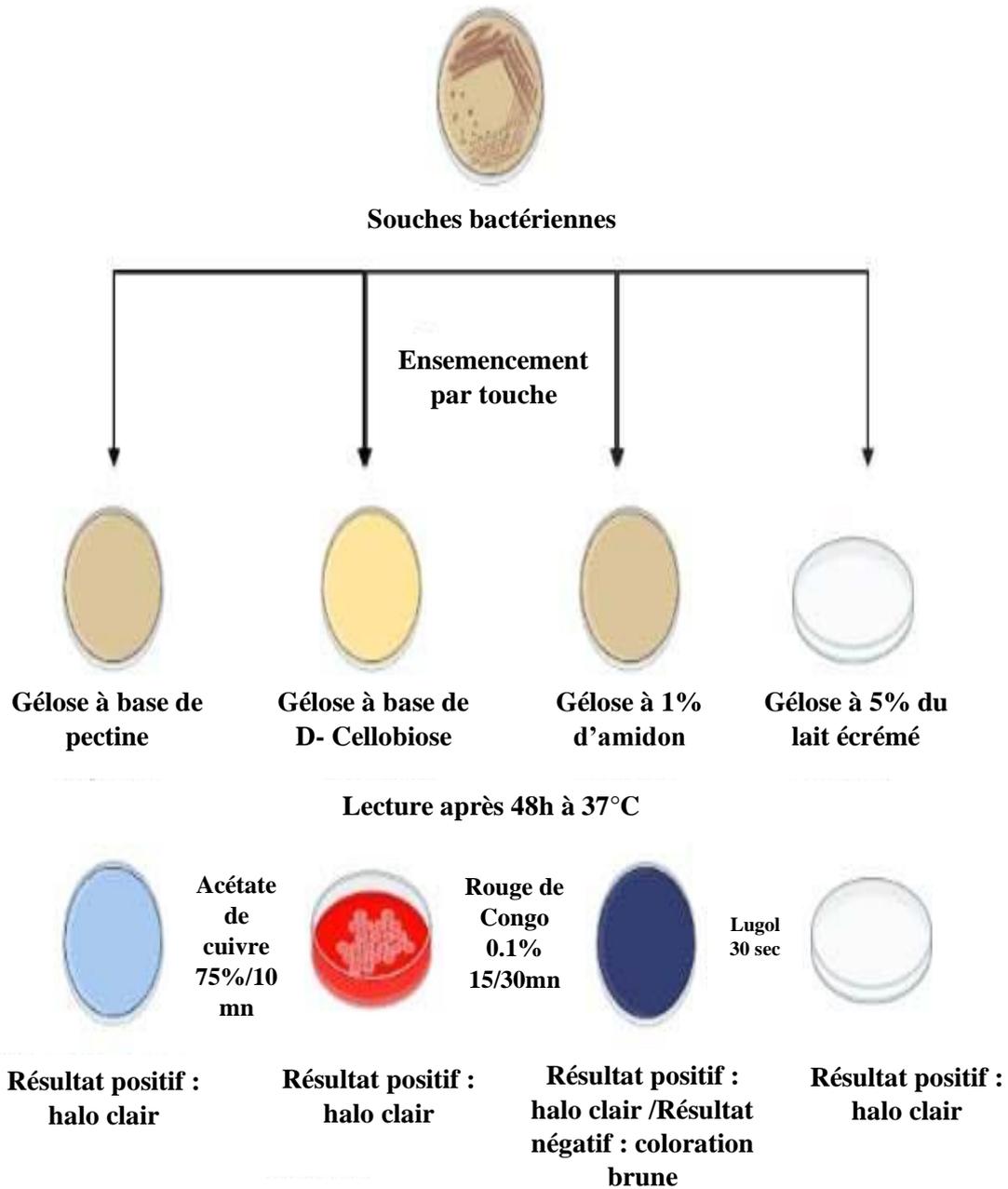


Figure 8: Schéma récapitulatif des étapes de la mise en évidence des activités enzymatiques.

Chapitre III :

Résultats

Un total de 20 échantillons de cônes de *Pinus halepensis* ont été récoltés pendant le mois de mai dans les forêts de la wilaya de Bouira, notamment à "Zbarbar Lakhdaria", "Bouaklane à Takerboust", "Haizar", "Tikjeda à El Asnam" et "Errich à Bouira". Des échantillons de "graines achetées" ont également été inclus, avec une quantité de 4g pour chaque échantillon.

Tableau II: Répartition des échantillons par régions dans la wilaya de Bouira.

Les sites de récolte	Nombre de cônes	Quantité nécessaire
Graines achetées	100 g	4g
Zbarbar	05	
Haizer	04	
Tikjeda	04	
Errich	04	
Bouaklane	03	

III.1. Souches bactériennes

Une croissance bactérienne a été observées à partir des trois milieux utilisés précédemment (eau peptonée, bouillon nutritif et eau distillée). Les résultats sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III: Répartition des souches bactériennes isolées pour chaque milieu.

Milieux	Bouillon nutritif	Eau peptonée	Eau distillé
Echantillons			
Graines achetées	+	+	-
Zbarbar	+	+	-
Zbarbar G. Nues	+	-	+
Haizer	+	+	-
Tikjeda	+	+	-
Errich	+	+	-
Bouaklane	+	+	-

Un total de 20 souches a été isolées à partir des 3 milieux sélectifs utilisés, dont 12 souches sur MacConkey ,4 souches sur milieu EMB et 4 souches sur milieu Chapman (**Annexe 05, Figure 9**).

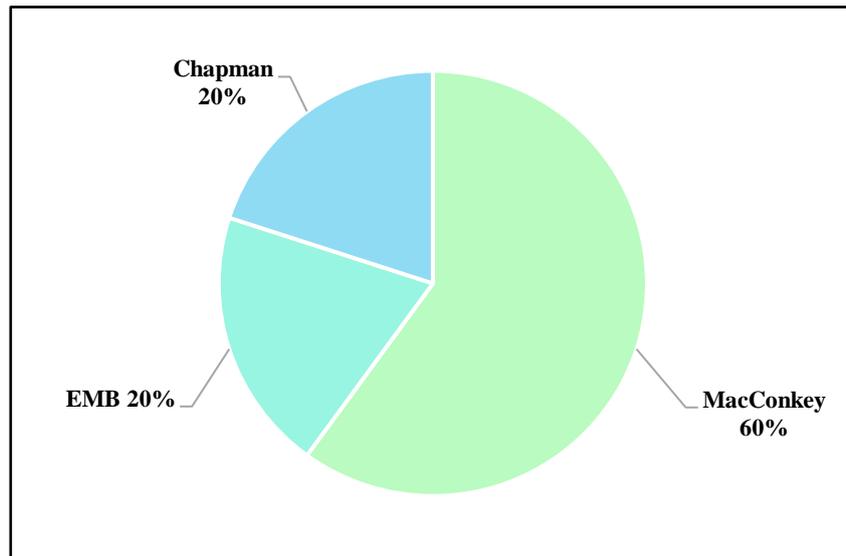


Figure 9: Taux de souches bactériennes sur chaque milieu (MacConkey, EMB, Chapman).

L'examen microscopique réalisé par coloration de Gram nous a permis d'observer différents aspects (Gram positif avec un taux de 20% et Gram négatif avec un taux de 80%).
(Figure 10)

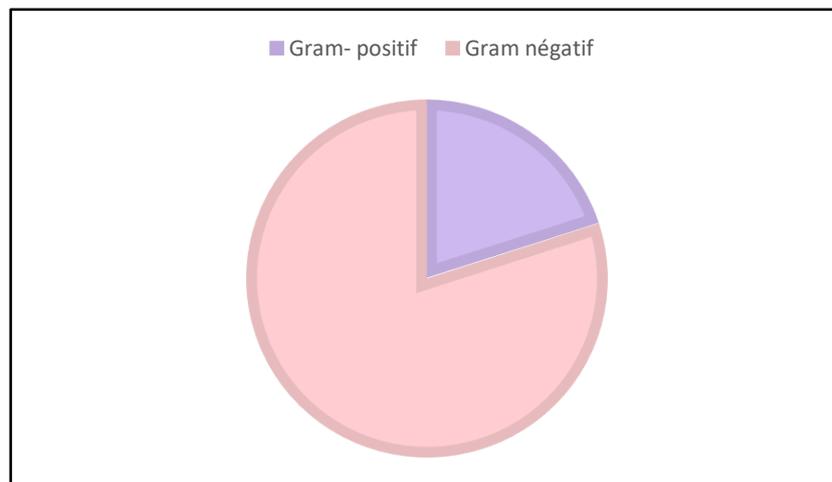


Figure 10: Pourcentage de souches à Gram -positif et Gram- négatif.

III.2. Identification bactérienne

L'identification des 20 souches à l'aide de la galerie classique a révélé qu'*Escherichia coli* était l'espèce la plus fréquemment isolée, avec un taux de 50% (10/20), suivie de *Klebsiella*

pneumoniae avec un taux de 30% (6/20), et le genre *Staphylococcus* avec un taux de 20% (4/20) (Figure 11).

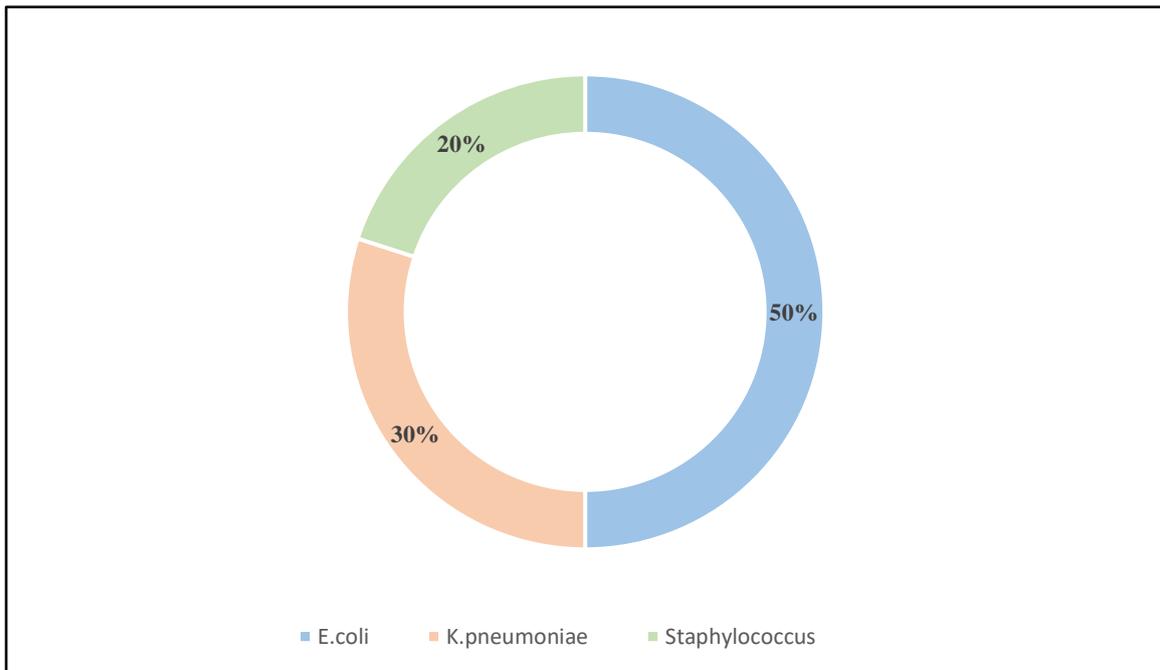


Figure 11: Taux de souches bactériennes isolées des graines de *Pinus halepensis*.

III.3. Résultats des activités enzymatiques

Une évaluation des activités protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et pectinolytiques a été réalisée sur des milieux contenant du lait écrémé, de l'amidon, de la D-cellobiose et de la pectine. Toutes les souches étudiées présentent au moins une activité hydrolytique.



Figure 12: Résultat de l'activité protéolytique



Figure 13: Résultat de l'activité amyolytique



Figure 14: Résultat de l'activité pectinolytique



Figure 15: Résultat de l'activité cellulolytique

Toutes les souches, notamment celles d'*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus*, ont démontré des activités hydrolytiques diverses. Elles ont présenté une forte activité protéolytique, avec un taux de 75%, indiquant leur capacité à hydrolyser les protéines grâce aux protéases (**Figure 12**). De plus, ces mêmes souches ont également exhibé une activité cellulolytique et amylolytique (**Figure 13,15**), atteignant des taux respectifs de 70% et 75%. Ces observations démontrent leur aptitude à hydrolyser la D-Cellobiose en glucose, un sucre plus simple, ainsi qu'à décomposer l'amidon en glucose.

Concernant l'activité pectinolytique, seulement les souches *Staphylococcus* et *Klebsiella pneumoniae* qui ont affiché un taux de 10% ont démontré leur capacité à hydrolyser la pectine grâce à l'action des pectinases (**Figure 14**).

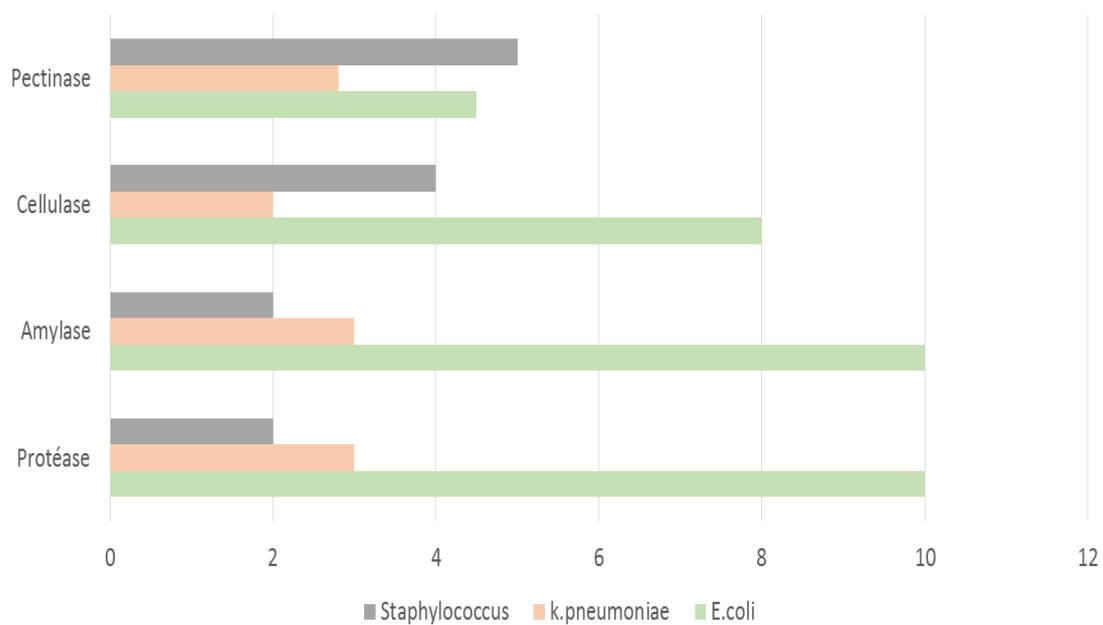


Figure 16: La production des enzymes par les graines de *Pinus halepensis*.

Chapitre IV :
Discussion générale

Jusqu'à présent, malgré plusieurs études portant sur les graines de *Pinus halepensis*, aucune recherche n'a encore été entreprise pour caractériser la microflore présente dans ces graines. Par conséquent, notre étude se démarque en tant que première tentative de rechercher et d'analyser la composition microbiologique des graines de *Pinus halepensis*, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans ce domaine de recherche.

Les graines, par leur nature exceptionnelle en tant qu'organe végétal, constituent une source inestimable d'informations sur l'origine et la composition du microbiote végétal. L'étude de la microflore endophyte des graines ouvre la voie à une compréhension approfondie de cette dynamique complexe. Cette connaissance approfondie du microbiote des graines peut alors catalyser le développement de produits biotechnologiques et industriels innovants.

Au cours de notre étude, nous avons identifié deux espèces bactériennes, à savoir *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, ainsi qu'un seul genre bactérien, *Staphylococcus*.

Selon nos résultats, nous avons constaté la présence d'une microflore endophyte dans les graines, avec *Escherichia coli* comme espèce prédominante, isolée à des taux de 50% dans les régions de « Haizer » et « Errich ». De manière similaire, l'espèce *Klebsiella pneumoniae* a été identifiée avec un taux de 30%, provenant des localités de « Tikjeda » et « Bouaklane ». Ces observations corroborent les résultats d'études antérieures menées par Midha et ses collègues en 2016 [5], ainsi que par Truyens et ses collègues en 2014 [44], qui ont également signalé la présence du phylum des *Gamma-Proteobacteria*, auquel appartiennent à la fois *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* dans les graines de riz .

Au cours de notre étude, nous avons constaté la présence de *Staphylococcus* dans les graines à un taux de 20% uniquement dans la région de « Zbarbar Lakhdaria ». Cette observation est en accord avec une étude antérieure menée par Truyens et ses collègues en 2013 [45], portant sur les graines d'*Arabidopsis thaliana*, ainsi qu'avec l'étude de Midha et ses collègues en 2016 [5], qui ont également signalé la présence de *Staphylococcus* dans les graines de riz.

Cependant, aucune souche n'a été identifiée à partir des graines achetées. Cela peut s'expliquer probablement par le traitement thermique des graines lors de l'ouverture des cônes, qui peut potentiellement altérer la flore endogène des graines de *Pinus halepensis*.

Lors de notre travail, nous avons comparé les graines entières de *Pinus halepensis* avec des graines dénudées de son tégument provenant de la région de Zbarbar Lakhdaria. Les résultats ont révélé l'absence de souches bactériennes dans les graines entières, tandis qu'une souche bactérienne, *Staphylococcus*, était présente dans les graines dénudées. Cette observation suggère que l'élimination du tégument selon l'étude menée par Kuźniar et ses collègues en 2020 [46] a probablement entraîné la disparition de la flore exogène de la graine, mettant en évidence que la souche de *Staphylococcus* se trouve probablement dans la partie endogène de la graine. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, des études supplémentaires doivent être réalisées. Ces futures recherches permettront de consolider notre compréhension de la distribution des micro-organismes dans les graines de *Pinus halepensis* et de confirmer l'importance du tégument dans la colonisation bactérienne des graines.

La disponibilité des nutriments dans l'environnement des microorganismes influence leur activité enzymatique, et cette activité est étroitement liée à leur capacité à s'adapter à leur milieu naturel. De plus, certaines souches se révèlent être plus adaptables aux variations de conditions de milieu, ce qui, associé à leur capacité à produire des enzymes, confère à ces souches des mécanismes métaboliques plus avancés par rapport aux souches dépourvues de ces capacités d'adaptation [47].

Un screening des activités protéolytiques, amylolytiques, cellulolytiques et pectinolytiques a été réalisé en utilisant des substrats spécifiques : lait écrémé, l'amidon, la cellobiose et la pectine respectivement. Les résultats obtenus après plusieurs essais, démontrant la présence d'au moins une activité hydrolytique chez toutes les souches étudiées.

Selon les résultats du screening, un taux de 75% de nos souches s'est avéré positif pour les protéases tel que la souche *E. coli*. Ces observations sont en accord avec les études antérieures de Gottesman en 1996 et Chung en 1993 [48-49] qui ont également rapporté la capacité significative d'*E. coli* à produire des protéases, probablement de type sérine ou métalloprotéase. De plus, *Klebsiella pneumoniae* et le genre *Staphylococcus* ont également démontré une activité protéolytique, ce qui est conforme aux résultats trouvés dans la littérature [50]. En effet, selon la littérature [51], les protéases microbiennes sont les plus utilisées dans divers secteurs tels que le textile, les détergents, le cuir, les aliments pour animaux, les déchets et bien d'autres. Avant l'utilisation des microorganismes dans la production de protéases, les industries utilisaient principalement des processus chimiques et des enzymes d'origine non microbienne. Les enzymes d'origine végétale et animale étaient les principales sources

d'enzymes utilisées dans diverses applications industrielles, ce qui impliquait des processus complexes et coûteux. Cependant, avec la découverte de souches de microorganismes capables de produire des protéases, il est désormais possible d'obtenir ces enzymes directement à partir de ces microorganismes, ce qui entraîne une réduction significative des coûts de production. Cette avancée offre de nouvelles perspectives quant à l'utilisation des protéases dans divers domaines, en proposant une solution plus économique et durable pour répondre à la demande croissante en enzymes protéolytiques. Ainsi, l'utilisation des protéases microbiennes présente un potentiel prometteur pour répondre aux besoins industriels tout en offrant des avantages économiques et environnementaux.

D'après les études menées par Raha et ses collaborateurs en 1992 [52], ainsi que par Lakshmi et ses collaborateurs en 2013 [53], il a été observé que les souches de *E. coli* et *Staphylococcus* testées ont la capacité de produire de l'amylase, probablement de type alpha-amylases. Par ailleurs, l'étude réalisée par Momma en 2000 [54] a également démontré l'activité amylolytique de la souche bactérienne *Klebsiella pneumoniae*. Nos propres constatations sont en accord avec ces résultats, révélant un taux de positivité de 75% des souches pour l'amylase. Il est important de souligner que les amylases microbiennes sont largement utilisées dans divers secteurs industriels tels que l'industrie alimentaire, textile, papetière et détergente. Ces enzymes jouent un rôle crucial en dégradant l'amidon en sucres plus simples, tels que le glucose, ce qui en fait des acteurs essentiels dans l'industrie [55].

Les résultats du screening ont révélé que 70% de nos souches présentaient une positivité pour les cellulases. D'après les résultats de l'étude menée par Barbosa et ses collaborateurs en 2020 [56], il a été démontré que *Klebsiella pneumoniae* présente une activité cellulolytique. Par ailleurs, selon l'étude menée par Thomas et ses collaborateurs en 2021 [57] *Staphylococcus* présente une activité cellulolytique. En revanche, pour *E. coli*, il a été observé dans la littérature que cette souche ne possède pas d'activité cellulolytique en raison de l'absence d'un gène codant pour cette enzyme. Cela est souligné par Gao et ses collaborateurs en 2015 [58]. Cependant, ces résultats ne concordent pas avec nos propres résultats, car nous avons observé une activité cellulolytique pour *E. coli*. Une explication possible pourrait être que nous n'avons pas utilisé le CMC comme substrat, mais plutôt la cellobiose, qui est moins complexe. Il est donc probable que notre souche ait pu dégrader la cellobiose, ce qui a conduit à un résultat positif. En effet l'utilisation de la cellulase microbienne présente des avantages écologiques par rapport aux matériaux traditionnels. Elle est renouvelable, biocompatible et biodégradable, contribuant

ainsi à réduire l'empreinte environnementale de nombreux produits et processus industriels [59].

Dans nos résultats, seules 10% de nos souches se sont révélées positives pour la pectinase. Ces résultats concordent avec l'étude menée par Zakia et ses collaborateurs en 2012, qui a également montré que *Klebsiella pneumoniae* et les *Staphylocoques* présentent une activité pectinolytique [60]. Cependant, *Escherichia coli* ne présente pas d'activité pectinolytique en raison de l'absence de gène codant pour cette enzyme comme l'ont souligné Zink et ses collaborateurs en 1985 [61].

Conclusion

Les plantes offrent de nombreux bienfaits pour l'environnement, y compris à travers leurs graines qui renferment des microorganismes endogènes. Ces microorganismes ont fait l'objet de plusieurs études récentes visant à démontrer leur présence dans différentes graines de plantes.

Il est intéressant de noter que peu de recherches approfondies ont été menées pour caractériser la composition microbiologique spécifique des graines de *Pinus halepensis*. C'est dans ce contexte que notre étude se positionne en tant que première tentative d'explorer cette facette encore peu connue de la microflore présente dans les graines de *Pinus halepensis*.

Dans cette étude, nous nous concentrons spécifiquement sur les graines de *Pinus halepensis* dans la wilaya de Bouira, et notre objectif principal est de combler cette lacune de connaissances en caractérisant la composition microbiologique spécifique de ces graines. Parallèlement, nous avons également effectué un dépistage des protéines fonctionnelles produites par les souches bactériennes associées à ces graines.

En réalisant cette étude, nous espérons contribuer à une meilleure compréhension de la diversité microbienne présente dans les graines de *Pinus halepensis*, ainsi qu'à une évaluation de leur potentiel fonctionnel. Ces résultats pourraient avoir des implications importantes pour la conservation et l'exploitation durable de cette espèce de plante, ainsi que pour d'autres applications dans les domaines de l'agriculture, de la microbiologie et de la biotechnologie.

Références bibliographiques

- [1] World Health Organization. Programme on Traditional Medicine, « Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle », Organisation mondiale de la Santé, WHO/EDM/TRM/2000.1, 2013. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68476>.
- [2] Z. Djerrad, L. Kadik, et A. Djouahri, « Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions », *Ind. Crops Prod.*, vol. 74, p. 440-449, 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.049.
- [3] P. P. Ferrer-Gallego et A. Farjon, « (2726) Proposal to conserve the name *PINUS HALEPENSIS* (*Pinaceae*) with a conserved type », *TAXON*, vol. 68, n° 6, p. 1368-1369, 2019, doi: 10.1002/tax.12170.
- [4] N. Kadri, B. Khettal, Y. Aid, S. Kherfellah, W. Sobhi, et V. Barragan-Montero, « Some physicochemical characteristics of *pinus* (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea*, *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents », *Food Chem.*, vol. 188, p. 184-192, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.138.
- [5] S. Midha, K. Bansal, S. Sharma, N. Kumar, P. Patil, V. Chaudhry, Genomic Resource of Rice Seed Associated Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, 2016. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01551>.
- [6] W. S. Judd, C. S. Campbell, E. A. Kellogg, et P. Stevens, Relation phylogénétique entre les principaux groupes de trachéophytes à l'exclusion des angiospermes «Spermatophytes non angiospermes », De Boeck. Paris: Botanique système.
- [7] N. Kadri, B. Khettal, A. Adjebli, T. Cresteil, R. Yahiaoui-Zaidi, V. Barragan-Montero, « Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds », *Ind. Crops Prod.*, vol. 54, p. 6-12, 2014.
- [8] S. Cheikh-Rouhou, B. Hentati, S. Besbes, C. Blecker, C. Deroanne, et H. Attia, « Chemical Composition and Lipid Fraction Characteristics of Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) Seeds Cultivated in Tunisia », *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 12, n° 5, p. 407-415, 2006, doi: 10.1177/1082013206069910.
- [9] M. N. Fotelli, E. Korakaki, S. A. Paparrizos, K. Radoglou, T. Awada, et A. Matzarakis, « Environmental Controls on the Seasonal Variation in Gas Exchange and Water Balance in a Near-Coastal Mediterranean *Pinus halepensis* Forest », *Forests*, vol. 10, n° 4, p. 313, 2019, doi: 10.3390/f10040313.

- [10] P. Ozenda, Les végétaux: organisation et diversité biologique / Paul Ozenda, ..., 2e édition. in Sciences Sup Sciences de la nature et de la vie. Paris: Dunod, 2000.
- [11] R. F. Fisher et P. Quezel, « Ecology, Biogeography and Management of *Pinus halepensis* and *P. brutia* Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin », For. Ecol. Manag., vol. 154, n° 1-2, p. 347, 2001, doi: 10.1016/S0378-1127(00)00635-6.
- [12] B. Guit, B. Nedjimi, F. Guibal, et G. Chakali, « Dendroécologie du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en fonction des paramètres stationnels dans le massif forestier de Senalba (Djelfa - Algérie) », Rev. D'Écologie Terre Vie, vol. 70, n° 1, p. 32-43, 2015, doi: 10.3406/revec.2015.1767.
- [13] K. Mezali, « La forêt algérienne: État des lieux et perspectives de développement in *P. Balandier*, D. Pumain, & A. Pierret », Les forêts méditerranéennes: Des espaces en mutation, des sociétés face à des défis, p. 83-88, 2006.
- [14] F. Boutchiche et S. Boutrigue, « Caractérisation morpho métrique de la chenille processionnaire (*Thaumetopoea pityocampa*) et de son hôte au niveau de la wilaya de Tlemcen », 2016.
- [15] L. Achoubi, « Etude phytosociologique et phytoécologique des formations à pin d'ALEP. (*Pinus halepensis* Mill) de l'étage bioclimatique semi-aride Algérien », Alger, 2005. Disponiblesur:
<https://www.ccdz.cerist.dz/admin/notice.php?id=00000000000000040377000000>.
- [16] Z. Djerrad, « Etude phytoécologique des provenances de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de la partie centrale de l'atlas Saharien, comparaison de la variabilité morphologique et chimique avec les pinedes du semi-arides est algérien », Faculté des Sciences Biologiques, 2016. Disponiblesur:
<https://www.ccdz.cerist.dz/admin/notice.php?id=000000000000000704299000104&publ>
- [17] M. Vennetier, C. Ripert, et C. Rathgeber, « Autecology and growth of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.): A comprehensive study in France », For. Ecol. Manag., vol. 413, p. 32-47, 2018, doi: 10.1016/j.foreco.2018.01.028.
- [18] A. Nicault, C. Rathgeber, L. Tessier, et A. Thomas, « Observations sur la mise en place du cerne chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.): confrontation entre les mesures de croissance radiale, de densité et les facteurs climatiques », Ann. For. Sci., vol. 58, n° 7, p. 769-784, 2001, doi: 10.1051/forest:2001162.

- [19] R. Calamassi, M. Falusi, et A. Tocci, « Effects of germination temperature and stratification on seed germination in *Pinus halepensis* Mill », *Silvae genetica*, vol. 33, n° 4/5, p. 133-139, 1984.
- [20] B. Prévosto, C. Ripert, G. Favand, J.M Lopez « Régénération du pin d'Alep en Basse Provence. Impact des traitements du sol, de la végétation et des rémanents. », 2009.
- [21] M. Kaplan, E. A. Mutlu, M. Benson, J. Z. Fields, A. Banan, et A. Keshavarzian, « Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders », *Complement. Ther. Med.*, vol. 15, n° 3, p. 207-216, 2007, doi: 10.1016/j.ctim.2006.06.005.
- [22] B. Boullard, *Plantes médicinales du monde Croyances et réalités*, Stem. 2001.
- [23] S. Dahham, Y.M. Tabana, M.A. Iqbal, MBK. Ahamed, M.O. Ezzat, A.S.A. Majid, A.M.S.A. Majiid « The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna* », *Molecules*, vol. 20, n° 7, p. 11808-11829, 2015, doi: 10.3390/molecules200711808.
- [24] C. Kizilarslan et E. Sevg, « Ethnobotanical uses of genus *Pinus* (*Pinaceae*) in Turkey », *Indian J. Tradit. Knowl.*, vol. 12 (2), p. 209-220, avr. 2013.
- [25] V. Hammiche, « Traitement de la toux à travers la pharmacopée traditionnelle kabyle », *Phytothérapie*, vol. 13, n° 6, p. 358-372, 2015, doi: 10.1007/s10298-014-0910-2.
- [26] M. Abi-Ayad, F.Z. Abi-Ayad, H.A. Lazzouni, S.A. Rebiahi, C. Ziani-Cherif and Bessiere « Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil », *J. Med. Plants Res.*, vol. 5, n° 22, p. 5433-5436, 2011, doi: 10.5897/JMPR.9000340.
- [27] M. Ghanmi, A. Farah, B. Satrani, H. Greche, El H. Harki, H. El Hajaji, M. Lachkar « Étude du rendement et de la composition de l'essence de térébenthine du Maroc: cas du Pin maritime (*Pinus pinaster*) et du Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) », *Acta Bot. Gallica*, vol. 152, n° 1, p. 3-10, 2005, doi: 10.1080/12538078.2005.10515450.
- [28] A. Bouyahya, O. Belmehdi, J. Abrini, N. Dakka, et Y. Bakri, « Chemical composition of *Mentha suaveolens* and *Pinus halepensis* essential oils and their antibacterial and antioxidant activities », *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 12, n° 3, p. 117, 2019, doi: 10.4103/1995-7645.254937.
- [29] H. Meziti, H. Bouriche, S. Kada, I. Demirtas, M. Kizil, et A. Senator, « Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts », *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, vol. 7, n° 4, p. 260-272, 2019.

- [30] E. Kotroni, E.Simirioti , S.Kikionis , Sfiniadakis , I.Siamidi , V.Karalis « In Vivo Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of Electrospun Micro/Nanofibrous Patches Loaded with *Pinus halepensis* Bark Extract on Hairless Mice Skin », *Materials*, vol. 12, n° 16, p. 2596, 2019, doi: 10.3390/ma12162596.
- [31] H.Ghazghazi, G. Rigane, M. El Aloui, et I. Taghouti, « Phytochemical Characterization of the Seed Oil of *Pinus halepensis* », *incredible/Innovation Network for Cork,Resin & Edibles*. kasserine, Tunisia, p. 3, 2020. Disponible sur: <https://www.nwfps.org/factsheet/phytochemical-characterization-of-the-seed-oil-of-pinus-halepensis/>.
- [32] H.Bouzena, N.Samout , E.Amani , S.Mbarki , Z.Tlili , I.Rjeibi , A.Elfeki , H.Talarmin , N . Hfaiedh « protective effects of *Pinus halpensis* essential oil on aspirin- induced Acute Liver and Kidney damage in Female Wistar Albino Rats », p. 1171-3000, 2016.
- [33] PA.Postu ,FZ. Sadiki ,M. El Idrissi, O.Cioanca , A.Trifan , M.Hancianu , « *Pinus halepensis* essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 112, p. 108673, 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108673.
- [34] K. Koutsaviti, A. Giatropoulos, D. Pitarokili, D. Papachristos, A. Michaelakis, et O. Tzakou, « Greek *Pinus* essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) », *Parasitol. Res.*, vol. 114, n° 2, p. 583-592, 2015, doi: 10.1007/s00436-014-4220-2.
- [35] L. Hamrouni, M. Hanana, I. Amri, A. E. Romane, S. Gargouri, et B. Jamoussi, « Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities », *Arch. Phytopathol. Plant Prot.*, vol. 48, n° 2, p. 145-158, 2015, doi: 10.1080/03235408.2014.884667.
- [36] M. Youcef Benkada, « Etude de l'inoculum séminicole de *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. Et caractérisation de souches par l'utilisation de profils protéiques et isoenzymatiques », *These de doctorat*, Toulouse, INPT, 1994. Disponible sur: <https://www.theses.fr/1994INPT029A>.
- [37] B. Houndji, R. Ouetchehou, S. Londji, K. Eamouzou, B. Yehouenou, et C. Ahohuendo, « Caractérisations microbiologiques et physico-chimiques de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (Lam.), un légume feuille traditionnel au Bénin », *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol. 7, n° 1, p. 75, 2013, doi: 10.4314/ijbcs.v7i1.7.

- [38] E. Alvarez, « New Assays for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in Soybean Seed », *Plant Dis.*, vol. 79, n° 1, p. 12, 1995, doi: 10.1094/PD-79-0012.
- [39] D. Fritze, « Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria », *Phytopathology®*, vol. 94, n° 11, p. 1245-1248, 2004, doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245.
- [40] « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes | SpringerLink ». <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-68489-5> .
- [41] J. M. Bragger, R. M. Daniel, T. Coolbear, et H. W. Morgan, « Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria », 1989, doi: 10.1007/BF00270794.
- [42] D. R. Boone, R. W. Castenholz, et G. M. Garrity, Éd., *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. New York: Springer, 2001.
- [43] J. Snaiki, A. Nadif, et M. Ouhssine, « Détection de deux pathotypes d' *Erwinia* causant la maladie de la pourriture molle sur la betterave à sucre dans la plaine du Gharb au Maroc: Détection de deux pathotypes d' *Erwinia* », *EPPO Bull.*, vol. 35, n° 3, p. 537-540, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2338.2005.00897.x.
- [44] S. Truyens, N. Weyens, A. Cuypers, et J. Vangronsveld, « Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants: Bacterial seed endophytes », *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 40-50, 2014, doi: 10.1111/1758-2229.12181.
- [45] S. Truyens, N. Weyens, A. Cuypers, et J. Vangronsveld, « Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally Cd-exposed *Arabidopsis thaliana* », *Plant Biol.*, vol. 15, n° 6, p. 971-981, 2013, doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00711.x.
- [46] A.Kuźniar ,K. Włodarczyk , J.Grządziel , M.Woźniak , K.Furtak , A.Gałązka « New Insight into the Composition of Wheat Seed Microbiota », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n° 13, p. 4634, 2020, doi: 10.3390/ijms21134634.
- [47] P. Feillet, *Le grain de blé: Composition et utilisation*. Editions Quae, 2000.
- [48] S. Gottesman, « PROTEASES AND THEIR TARGETS IN *ESCHERICHIA COLI* », *Annu. Rev. Genet.*, vol. 30, n° 1, p. 465-506, 1996, doi: 10.1146/annurev.genet.30.1.465.
- [49] C. H. Chung, « Proteases in *Escherichia coli* », *Science*, vol. 262, n° 5132, p. 372-374, 1993, doi: 10.1126/science.8211156.
- [50] AV.Trishin , MI.Zhdanovich , LV.Savvateeva , AI.Toptygin , FV.Donenko , MV.Kiselevskiï , « Protease activity of *Klebsiella pneumoniae* of different virulence », *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, n o 4, p. 7-11, 2004.

- [51] A. Razzaq , S. Chamsi , A.Ali · Q.Ali , M.Sajjad , A.Malik , M. Achraf « Microbial Proteases Applications », *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 110, 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00110.
- [52] M. Raha, I. Kawagishi, V. Müller, M. Kihara, et R. M. Macnab, « *Escherichia coli* produces a cytoplasmic alpha-amylase, AmyA », *J. Bacteriol.*, vol. 174, n° 20, p. 6644-6652, 1992, doi: 10.1128/jb.174.20.6644-6652.1992.
- [53] HP.Lakshmi , UV.Prasad, S.Yeswanth , V.Swarupa, OH .Prasad , ML.Narasu , Molecular characterization of α -amylase from *Staphylococcus aureus*. *Bioinformation*. vol.9.n°6,p.281-5,2013.
- [54] M. Momma, « Cloning and Sequencing of the Maltohexaose-producing Amylase Gene of *Klebsiella pneumoniae* », *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 64, n° 2, p. 428-431, 2000, doi: 10.1271/bbb.64.428.
- [55] P. M. de Souza et P. de Oliveira Magalhães, « Application of microbial α -amylase in industry - A review », *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.*, vol. 41, n° 4, p. 850-861, 2010, doi: 10.1590/S1517-83822010000400004.
- [56] K. L. Barbosa , V.Rodrigues dos Santos Malta, S.Salgueiro Machado, Gildemberg Amorim Leal Junior, AP Vieira da Silva, Renata Maria Rosas Garcia Almeida, Jose Maria Rodrigues da Luz « Bacterial cellulase from the intestinal tract of the sugarcane borer », *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 161, p. 441-448, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.042.
- [57] T., A., LAXMI, et BENNY, A. Bioethanol Production of Cellulase Producing Bacteria from Soils of Agrowaste Field. *Journal of Scientific Research*, 2021, vol. 13, no2.
- [58] D. Gao, Y. Luan, Q. Wang, Q. Liang, et Q. Qi, « Construction of cellulose-utilizing *Escherichia coli* based on a secretable cellulase », *Microb. Cell Factories*, vol. 14, n° 1, p. 159, 2015, doi: 10.1186/s12934-015-0349-7.
- [59] U. Ejaz, M. Sohail, et A. Ghanemi, « Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications », *Biomimetics*, vol. 6, n° 3, p. 44, 2021, doi: 10.3390/biomimetics6030044.
- [60] L. Zakia et S. Muhammad, « Molecular characterization of polygalacturonase producing *Klebsiella* and *Staphylococcus* species by 16S rRNA sequencing collected from rotten fruits and vegetables », *Afr. J. Microbiol. Res.*, vol. 6, n° 46, p. 7319-7323, 2012, doi: 10.5897/AJMR12.957.

- [61] R. T. Zink et A. K. Chatterjee, « Cloning and expression in *Escherichia coli* of pectinase genes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 49, n° 3, p. 714-717, 1985.

Annexes

Annexe 01 : Solutions

- **Préparation de l'eau de javel à 10 %**

Prélever 10ml de l'eau de javel ensuite ajouter 90ml de l'eau distillé stérile pour avoir l'eau de javel à 10%.

- **Solution de chlorure de sodium (NaCl) 1M**

Chlorure de sodium.....58,44g

Eau distillée.....1000ml

Annexe 02 : Coloration de Gram

- Effectuer un frottis fixé : sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile. Ajouter une colonie isolée. Étaler et fixer à la chaleur.
- Coloration par le violet de gentiane. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau.
- Mordantage au Lugol : Laisser agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau déminéralisée.
- Décoloration à l'alcool : Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration.
- Recoloration à la fuchsine : Mettre de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée.
- Séchez la lame à la chaleur.
- Observer au microscope optique avec une goutte d'huile à immersion au grossissement($G \times 1000$).

Annexe 03 : Milieux pour les tests enzymatiques**Milieu gélosé à 5% de lait écrémé**

Lait écrémé	50ml
Agar.....	10g
Eau distillée.....	1000ml

Milieu gélose à 1 % amidon

Gélose nutritive.....	1000ml
Amidon.....	10g

Milieu gélosé à 0,5% de cellobiose

Gélose nutritive.....	1000ml
Cellobiose	5g

Milieu pectine-agar

Pectine.....	5g
Extrait de levure.....	5g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Annexe 04 : Les indicateurs colorés**Rouge Congo à 0.1%**

Rouge Congo	0.1g
Eau distillée	1000ml

- Dissoudre 0.1g de Rouge Congo dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 1000ml.

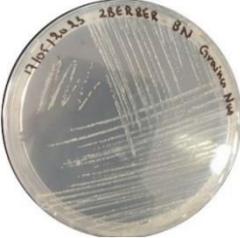
Acétate de cuivre à 0,7%

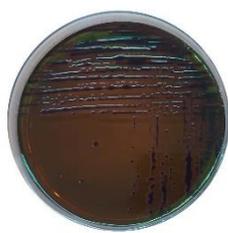
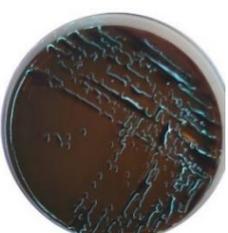
Acétate de cuivre.....	7,5g
------------------------	------

Eau distillée.....1000ml

- Dissoudre 7,5g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 1000ml.

Annexe 05

Milieux Echantillons	Gélose nutritif	MacConkey	Chapman	EMB
Graines achetés		Pas de colonies	Pas de colonies	Pas de colonies
Zbarbar		Pas de colonies	Pas de colonies	Pas de colonies
Zbarbar G.Nues		Pas de colonies		Pas de colonies
Haizer			Pas de colonies	Pas de colonies
Tikjeda		Pas de colonies	Pas de colonies	Pas de colonies

Errich			Pas de colonies	
Bouaklane				

Résumé

Les plantes hébergent diverses espèces endophytes, notamment des bactéries endophytes des graines. Malgré les nombreuses études portant sur la caractérisation microbiologique des graines de plantes, on connaît encore très peu de choses sur les endophytes microbiens présents dans les graines de *Pinus halepensis*. L'objectif de cette étude est de caractériser la microflore bactérienne des graines de *Pinus halepensis* et screening des protéines fonctionnelles produites par cette microflore. Nos résultats ont révélé la présence de souches bactériennes dans ces graines, telles que *E. coli* (50%), *Klebsiella pneumoniae* (30%) et *Staphylococcus* (20%). Dans notre étude en laboratoire, nous avons examiné que toutes les souches bactériennes présentent au moins une activité enzymatique (protéolytique, amylolytique, cellulolytique et pectinolytique). Ce travail a permis de mettre en évidence, pour la première fois, la présence d'une microflore endophyte dans les graines de *Pinus halepensis*, qui constitue une source potentielle d'enzymes extrêmement intéressantes pour leurs applications industrielles.

Mots clés : Graines, *Pinus halepensis*, enzymes, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus*.

Abstract

Plants host various endophytic species, including seed endophytic bacteria. Despite numerous studies on the microbiological characterization of plant seeds, very little is known about the microbial endophytes present in *Pinus halepensis* seeds. The objective of this study is to characterize the bacterial microflora of *Pinus halepensis* seeds and screen for functional proteins produced by this microflora. Our results revealed the presence of bacterial strains in these seeds, such as *E. coli* (50%), *Klebsiella pneumoniae* (30%), and *Staphylococcus* (20%). In our laboratory study, we examined that all bacterial strains exhibit at least one enzymatic activity (proteolytic, amylolytic, cellulolytic, and pectinolytic). This work highlighted, for the first time, the presence of an endophytic microflora in *Pinus halepensis* seeds, which represents a potential source of highly interesting enzymes for industrial applications.

Keywords : Seeds, *Pinus halepensis*, enzymes, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus*.

ملخص

النباتات تحتضن أنواعًا متعددة من الأحياء الداخلية، بما في ذلك البكتيريا الداخلية للبذور. على الرغم من الدراسات العديدة حول التوصيف الميكروبيولوجي لبذور النباتات، إلا أننا نعلم القليل جدًا عن الأحياء المجهرية الداخلية المتواجدة في بذور *Pinus halepensis*. هدف هذه الدراسة هو توصيف الميكروفلورا البكتيرية لبذور *Pinus halepensis* وفحص البروتينات الوظيفية التي تنتجها هذه الميكروفلورا. أظهرت نتائجنا وجود سلالات بكتيرية في هذه البذور، مثل *E. coli* (50%) و *Klebsiella pneumoniae* (30%) و *Staphylococcus* (20%) في دراستنا في المختبر، فحصنا وجود نشاط إنزيمي واحد على الأقل في جميع سلالات البكتيريا (بروتيناز، نشوي، خلوي، وبكتينازي). أبرز هذا العمل، لأول مرة، وجود ميكروفلورا داخلية في بذور *Pinus halepensis* والتي تمثل مصدرًا محتملاً لإنزيمات مثيرة للاهتمام للتطبيقات الصناعية.

الكلمات الرئيسية : *Pinus halepensis*، إنزيمات، *E. coli*، *K. pneumoniae*، *Staphylococcus* : بذور.