

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

Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2022



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

Domaine : SNV

Filière : Biotechnologie

Spécialité: Biotechnologie microbienne

Présenté par :

ATMANE Ilhem & DJOUADI Manel

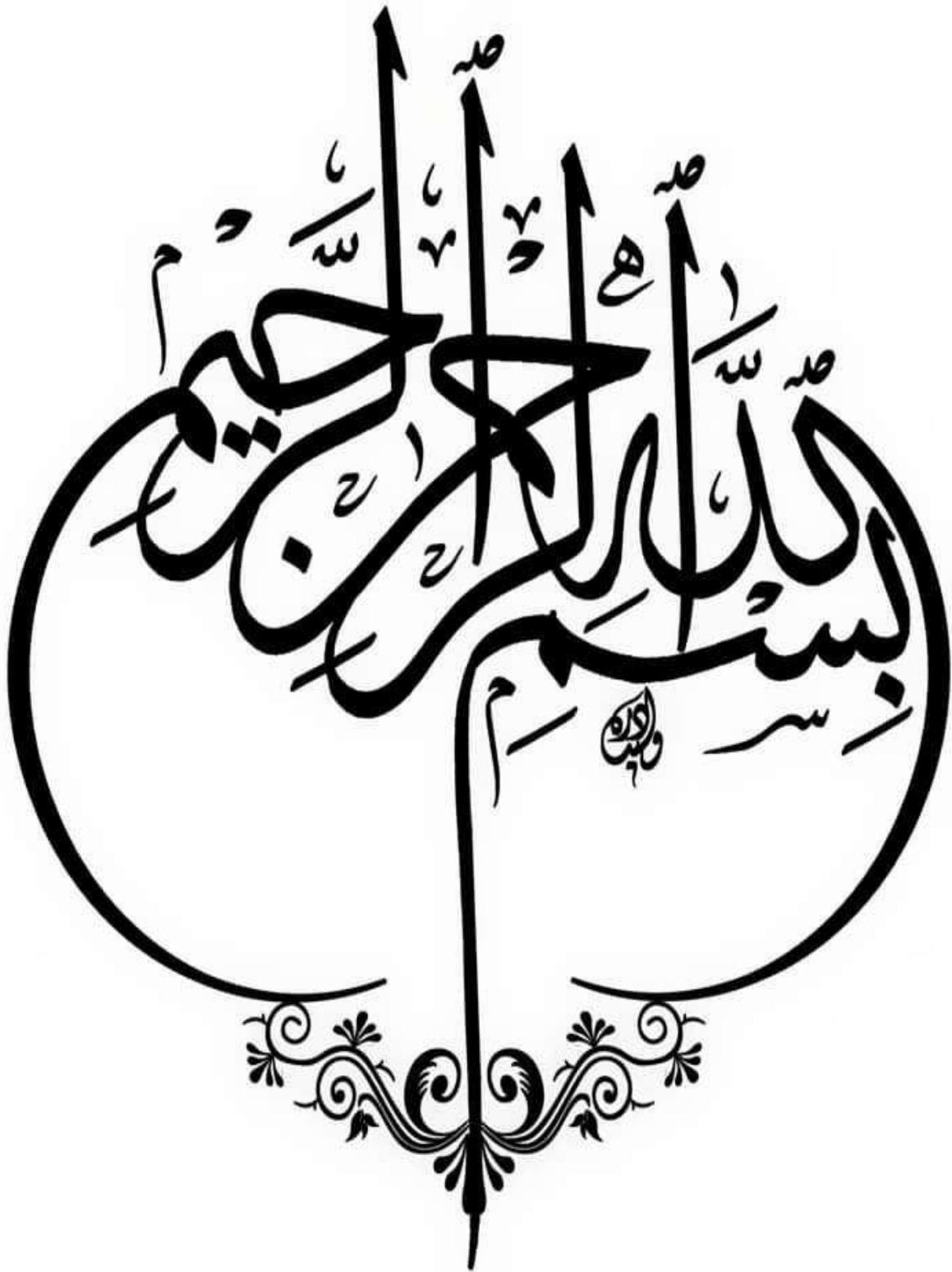
Etude des activités biologiques de l'extrait éthanolique de
Pinuspinaster

Soutenu le: 04 / 07/2022

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. LAMINE .S</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. LEBDIRI .F</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Mme. Cherifi .Z</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2021/ 2022



Remerciements

AU NOM D'ALLAH LE CLEMENT LE MISERICORDIEUX PAIX ET
SALAM SUR SON PROPHETE MOHAMMED

« الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله ».

Avant tout nous tenons à remercier Allah qui nous a créés, protégé, aidé et celui qui nous a donné la force, la patience et le courage pour pouvoir accomplir notre travail dans les meilleures conditions en disant « Dieu Merci ».

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à **M^rLIBDIRI, F.** professeur encadrant pour son soutien et pour son aide.*

Nous remercions les membres de jury, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner cette étude aussi modeste qu'elle soit.

*Nous tenons aussi à remercier **M^rHANSALI, K.** qui nous a guidé conseillé tout au cours de notre stage*

Un grand merci pour nos parents pour leur grand soutien tout au long de notre cursus et pour la confiance qu'ils nous ont toujours témoignée.

Enfin, nous remercions tous ceux de près ou de loin qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci 

Dédicace

Au nom de Dieu le tout puissant, celui qui m'a donné la vie et qui m'a permis d'apprendre Et d'acquérir ce savoir, je dédie ce modeste travail à :

*Ma chère maman **Nadia** :*

Quoi que je fasse ou que je dise. Ne saura point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence a mes cotés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles

*Au meilleur des pères **Nacer** :*

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consentis pour mon instruction et mon bien être .tu as toujours été a mes cotés pour me soutenir et m'encourager.que ce travail traduit ma gratitude et mon affection

*A ma chère petite sœur **Halla** La prunelle de mes yeux. Puisse dieu te donne santé, bonheur, et surtout réussite.*

Merci pour votre générosité, votre affection, votre soutien moral et financier, que Dieu le tout puissant, vous protège et vous garde.

*A la mémoire de ma grand mère « **nana baha** »que dieu la bénisse dans son vaste Paradis.*

*A mon amie et binôme, **Ilham** celle avec qui j'ai partagé ce travail et a sa famille.*

Manel 

Dédicace

Grace à dieu tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté, la force pour réaliser Ce mémoire, que nul ne peut se faire sans son désir. On dédie ce modeste travail

*A la mémoire de mon père «**Mohamed**»*

Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de mon père décède, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. , J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme,

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

*A ma chère mère «**Fatima** »*

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit exactement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, puisse Dieu, le très Haut, vous accorder sante, bonheur et longue vie.

*A mon frère et ma sœur : «**Charafeddine** » et «**Nourelhouda**»*

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

A mon binôme

*Chère amie«**Manel**» avec qui j'ai passé des moments inoubliables au cours de la réalisation de ce travail.*

A tous ceux qui m'ont aidée pour la réalisation de ce mémoire, ainsi que mes amis et collègues de la promotion de biotechnologie microbienne.

A tous ceux qui m'ont aimé



Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction01

Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre I : la phytothérapie et les plantes médicinales

I. Généralité sur la phytothérapie04

I.1. Définition de la phytothérapie.....04

I.2. Les types de la phytothérapie04

II. Généralité sur les plantes médicinales05

II.1. Définition des plantes médicinales05

II.2. L'intérêt d'étude des plantes médicinales.....05

II.3. Domaine d'utilisation des plantes médicinales.....05

II.4. Modes de Préparation des Plantes pour la Phytothérapie06

Chapitres II : Le *Pinus pinaster*

I. Généralité sur le *Pinus pinaster*.....08

I.1. Définition08

I.2. Origine et répartition.....09

I.3. Les noms vernaculaires11

I.4. Classification11

I.5. Description12

II. Utilisation de *Pinus pinaster*.....15

II.1. Utilisation thérapeutique16

II.1.1. Activité anti diabétique et anti inflammatoire.....16

II.1.2. Activité anti oxydante16

II.2. Utilisation pharmaceutique17

II.2.1. Picnogynol.....17

II.2.1.a. Définition.....17

II.2.1.b. Effet sur la santé17

II.2.1.c. Effet sur le sang18

II.2.1.d. Toxicité.....18

III. Toxicité de <i>Pinuspinaster</i>	19
---	----

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthode

I. Matériels.....	21
I.1. Biologique.....	21
I.2. Microbiologique.....	21
I.3. Végétal	21
II. Méthodes.....	22
II.1. Préparation de matériels végétales	22
II.2. Préparation de l'extrait brute.....	23
II.3. Méthodes analytique	25
II.3.1. Calcul de rendement	25
II.3.2. Dosage des polyphénols.....	26
II.3.3. Dosage des flavonoïdes.....	27
II.3.4. Activité anti-oxydante.....	29
II.3.4.1. Teste de DPPH	29
II.3.4.2. Détermination d'IC50.....	30
II.4. Analyses biologiques des extraits.....	30
II.4.1. Activité Anti Bactérienne.....	30
II.4.2. Identification des Glycosides cardiaque	32

Chapitre IV : Résultats et discussion

I. Résultats de calcul du rendement pour chaque extraction.....	34
II. Résultats du Dosage des polyphénols.....	35
III. Résultats du Dosage des flavonoïdes totaux.....	36
IV. Résultat de l'activité antioxydante.....	38
IV.1. Test au DPPH.....	38
IV.2. Calculs de IC50 dans les différentes parties de <i>Pinuspinaster</i>	41
V. Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne	42
VI. Résultats de l'identification des Glycosides cardiaque.....	46
Conclusion	48

Références

Annexe

Résumé

Liste des abréviations

D1 : Dilution numéro 1

DI:Diameter d'inhibition

DO: Densité optique

DPPH :Diphénylpicryl-hydrazine

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

I% : Pourcentage d'inhibition.

IC₅₀ : La concentration inhibitrice à 50 %.

mgEq AG/g : Milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme

ml : Millilitre

nm : Nanomètre

PBE : Extrait d'écorce de *Pin maritime*

PYC :Pycnogénol

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SM :Solution mère

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de pin maritime	11
Tableau 2 : Tableau des rendements des extraits des différentes parties de <i>pinuspinaster</i>	34
Tableau 3 : Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les extraits éthanoliques des parties de <i>Pinuspinaster</i>	35
Tableau 4 : Résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des parties de <i>Pinuspinaster</i>	37
Tableau 5 : Résultats de l'activité anti-oxydante obtenus pour l'extrait d'écorce de <i>Pinuspinaster</i>	38
Tableau 6 : Résultats de l'activité antioxydante obtenus pour l'extrait des feuilles vertes de <i>Pinuspinaster</i>	39
Tableau 7 : Résultats de l'activité antioxydante obtenus pour l'extrait des feuilles séchées de <i>Pinuspinaster</i>	40
Tableau 8 : Effet inhibiteur des extraits des feuilles vertes et séchées et de l'écorce sur la culture de <i>Staphylococuss</i>	43
Tableau 9 : Effet inhibiteur des extraits sur <i>Pseudomonass</i>	44

Liste des figures

Figure 1 : Un arbre de <i>Pinuspinaster</i>	8
Figure 2 : Distribution du chêneliège dans son aire géographique méditerranéenne et atlantique (Zeraia, 1981)	10
Figure 3 : Feuilles et écorce de <i>Pinuspinaster</i>	13
Figure 4 : Fleure de <i>PinusPinaster</i>	13
Figure 5 : Le bourgeon de pin maritime	14
Figure 6 : Le fruit de <i>Pin maritime</i>	14
Figure 7 : Les grains de pin maritime	15
Figure 8 : LePycnogenol.....	19
Figure 9 :Les poudres de l'écorce et des feuilles séchées de <i>Pinuspinaster</i>	22
Figure 10 :Procédure d'extraction	24
Figure 11 : Image représente le poids des 3 extraits.....	25
Figure 12 :Courbe d'étalonnage du standard acide gallique utilisé dans le dosage des polyphénols totaux	27
Figure 13 : Courbe d'étalonnage du standard Quercétine utilisé dans le dosage des flavonoïdes.....	28
Figure 14 :Images représentant la manipulation de protocole d'identification des glycosides cardiaques	32
Figure 15 :Histogramme des rendements de différentes parties de <i>Pinuspinaster</i>	34
Figure 16 :Histogramme représente les teneur en polyphénols totaux des extraitséthanolique des parties de <i>Pinuspinaster</i>	36
Figure 17 :Histogramme représente les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanolique des parties de <i>Pinuspinaster</i>	37
Figure 18 :Profils de l'activité antioxydante de l'extraitéthanoliques d'écorce de <i>Pinuspinaster</i>	39
Figure 19 : Profils de l'activité antioxydante de l'extraitéthanoliques des feuilles vertes de <i>Pinuspinaster</i>	40
Figure 20 : Profils de l'activité antioxydante de l'extraitéthanoliques des feuilles séchées de <i>Pinuspinaster</i> ...	41
Figure 21 :Histogramme représente les IC 50 des 3 extraits éthanoliques	41
Figure 22 :Histogramme représente l'effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur la culture de <i>Staphylococuss aureus</i>	43
Figure 23 :image des zones d'inhibition des trois extrais sur <i>staphylococuss aureus</i>	44
Figure 24 : Histogramme représente l'effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur la culture de <i>Pseudomonass</i>	44
Figure 26 : Image des zones d'inhibition des trois extraits sur <i>Pseudomonass</i>	45
Figure 27 : Image représente l'apparition des glycosides cardiaque dans l'écorce de <i>Pinuspinaster</i>	46

Introduction

Introduction

A l'origine, la nature constituée essentiellement d'êtres végétaux servait d'alimentation aux animaux et aux êtres humains. Mais à côté de cette fonction nutritionnelle, l'homme découvrit bien d'autres fonctions que pouvaient lui procurer les plantes, notamment le pouvoir de guérison. Comme traitement de la grippe et les maladies liées au tube digestif. **(Kahlouche-riache.2014)**

En effet cette faculté de guérison des plantes fut connue longtemps de nos ancêtres depuis, les temps reculés. Elle deviendra plus tard la médecine traditionnelle avec toutes les avancées notoires qu'on peut lui attribuer. **(Kahlouche-riache.2014)**

Il existe actuellement un grand intérêt pour l'utilisation des plantes médicinales pour lutter contre diverses maladies pour le maintien de la santé humaine, et il est important de comprendre leur composition chimique et de déterminer leur activité biologique en raison de leurs propriétés médicinales, et ces propriétés sont certainement dues aux substances biologiquement actives qu'elles contiennent. **(Belksir et Ferdi.2021)**

Les plantes médicinales sont une bonne source de produits naturels pouvant avoir une activité antimicrobienne, antidiabétique, et anti-inflammatoire. Ceci en raison de leur richesse en métabolites secondaires tels que le flavonoïde et les composés phénoliques. **(Belksir et Ferdi.2021)**

La flore algérienne et ses 3000 espèces appartiennent à plusieurs familles de plantes, dont 15% sont endémiques **(Oksuz et Topcu.1987)** et le reste peu explorée en phytochimie et en pharmacologie

Pinus pinaster est l'une des plantes médicinales les plus connues d'Algérie. Elle est considérée comme un bon remède pour le traitement des ulcères, la carence en vitamine c, la prévention l'agrégation plaquettaire, la réduction des concentrations de thromboxane, le traitement des microhémorragies rétinienne.

L'objectif de notre travail est de préparer des extraits éthanolique à partir de différentes parties de *Pinus pinaster* (écorce, feuilles vertes, feuilles séchées) et d'évaluer leur activité biologique (antioxydant. anti-inflammatoire. antibactérienne) ainsi d'identifier les glycosides cardiaque.

Le présent travail est structuré en en deux grandes parties :

- Une synthèse bibliographique composée de deux chapitres :
 - le premier chapitre généralités sur la phytothérapie et les plantes médicinales
 - le deuxième chapitre consiste à donner des généralités sur le *Pinus pinaster*
- Tandis que l'étude expérimentale concerne :
 - la description du matériel végétal,
 - les méthodes d'extractions ainsi que les méthodes d'évaluation des activités biologiques (antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire)
 - chapitre qui englobera les résultats et discussion.
 - Enfin on termine par une conclusion.

Chapitre I

*La phytothérapie et les plantes
médicinales*

I. Généralité sur la phytothérapie

I.1. Définition de la phytothérapie

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : phuton et therapeia qui signifient respectivement "plante" et "traitement".

Ainsi, la phytothérapie peut être définie comme une discipline de la médecine allopathique visant à Prévenir et traiter certains dysfonctionnements ou certains états pathologiques avec des plantes (parties de plantes ou préparations à base de plantes), qu'elles soient utilisées par voie topique ou externe. (**Wichtl , Anton .2003**)

La phytothérapie elle-même est reconnue par l'Académie de médecine depuis 1987 (**Jean-Yves Chabrier.2010**)

Il est important de ne pas confondre cette discipline avec la pharmacie botanique, qu'elle désigne toutes les substances utilisées dans le traitement des plantes, c'est-à-dire les pesticides, Fongicides, herbicides et même insecticides (**Jean-Yves Chabrier.2010**).

I.2. Les types de phytothérapies

Le premier est la phytothérapie traditionnelle. C'est une thérapie alternative conçue pour traiter les symptômes de la maladie. Son origine peut parfois être très ancienne, elle repose sur l'utilisation des plantes selon les vertus découvertes Empiriquement (**Jean-Yves Chabrier.2010**). Les indications pertinentes sont de première intention, propres au conseil pharmaceutique. Elles concernent notamment les maladies saisonnières depuis les troubles psychosomatiques légers jusqu'aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques (**Leclerc.1999**).

La deuxième forme est la phytothérapie clinique. C'est une médecine de terrain dans laquelle le patient passe avant la maladie. Une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet (**Moreau B.2003**). Son mode d'action est basé sur un traitement à long terme agissant sur le système neuro-végétatif. Cette fois-ci les indications sont liées à une thérapie de complémentarité. Elles viennent compléter ou renforcer l'efficacité d'un traitement allopathique classique pour des pathologies aiguës d'importance modérée (infection grippale, maladies O.R.L...). On agit principalement sur les effets secondaires. (**Jean-Yves Chabrier.2010**).

I. Généralité sur les plantes médicinales

II.1.Définition

Les plantes médicinales sont des plantes dont un des organes (feuille, écorce) possède des vertus curatives et parfois toxiques selon son dosage. Les plantes médicinales sont les plantes utilisées en phytothérapie pour leurs principes actifs, elles peuvent être vendues en herboristerie, en pharmacie, avec ou sans prescription selon la réglementation du pays.

II.2.L'intérêt d'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir sur l'organisme humain et animal et elles présentent des avantages dépourvus dans les médicaments; grâce à technologies modernes aux connaissances traditionnelles, 25% des médicaments modernes sont dérivés de plantes médicinales. **(Arab et Ouchichi.2018)**

Chaque partie de la plante possède des propriétés thérapeutiques, donc on peut utiliser la plante entière ou seulement une partie (feuilles, fruits, fleurs, écorce...)

Principe actif :

C'est une molécule contenu dans une drogue végétale, présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'Homme ou l'animal. **(Chagne, 2004).**

II.3.L'utilisation des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont utilisées pour prévenir, traiter ou soulager diverses maladies. Lorsque la médecine traditionnelle a émergé, ce savoir ancestral a été mis de côté au profit des médicaments délivrés sur ordonnance, souvent plus efficaces et d'action plus rapide que les médicaments traditionnels utilisés auparavant. D'autre part, nous assistons aujourd'hui au retour de l'utilisation des plantes médicinales pour favoriser la santé. Chaque plante médicinale a sa propre définition et ses usages spécifiques.**(Kansole M. 2009)**

La plupart des espèces végétales cultivées dans le monde ont des vertus thérapeutiques car elles contiennent des principes qui agissent directement sur l'organisme. Ils sont utilisés aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : en effet, ils présentent des avantages qui manquent souvent aux médicaments.**(Decaux I. 2002)**

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et le développement de médicaments, non seulement lorsque les composants végétaux sont utilisés

directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour des composés pharmacologiquement actifs. (Decaux I. 2002)

II.4. Modes de Préparation des Plantes pour la Phytothérapie

En phytothérapie, il y a plusieurs modes de préparation des plantes, selon l'usage que l'on veut faire. Les modes de préparation les plus courants :

1) L'Infusion :

Pour obtenir une infusion, en plongeant une plante pendant une durée de 5 à 15 minutes (selon la plante) dans de l'eau bouillante dans un récipient couvert. Avant d'être utilisée l'infusion doit être filtrée.

2) La Décoction :

En mettre la plante dans l'eau froide, puis la faire bouillir entre 2 à 15 minutes (les écorces et les racines doivent bouillir plus longtemps que les feuilles et les tiges).

3) La Macération :

On obtient une macération, en laissant une plante dans un solvant (eau, vin, alcool ou huile) à froid à l'abri de l'air et de la lumière pendant un temps assez long (de quelques heures à plusieurs jours). Après en filtrer le mélange à travers un filtre papier. (Benghanou, 2012).

Chapitre II
Pinus Pinaster

I. Généralité sur le pinuspinaster

I.1. Définition

Selon William Aiton, 1789, *Pinus* est le genre des conifères le plus largement étendu dans la famille des *Pinaceae* avec plus de 100 espèces.comprenant notamment le pin maritime (*Pinuspinaster* ou *Pinusmaritima*). (Kahlouche-Riache,F.2013)

Le pin maritime est un arbre qui dépasse généralement 20m de hauteur et peut atteindre jusqu'à 30-40m. (Djamaa et Moumni.2008) la maturité est d'environ 40 ou 50 ans, avec une durée de vie pouvant aller jusqu'a 500 ans (Rameau et al. 2008). Il est conique, et s'arrondit avec le temps. Avec une écorce brun rougeâtre claire. Ses feuilles ont un port étalé de conifère et ses aiguilles sont poussent par paires ;mesurent de 10 à 20 cm de longueur, sont vert foncé et très dures. Ses cônes sont ovales, bruns et longs de 2 cm (Pullaiah, 2006).

C'est un arbre qui a peu d'exigences en matière de sol et qui bien adapté aux conditions difficiles du bord de mer.



Figure 1 : Un arbre de *Pinuspinaster*

I.2. Origine et répartition

I.2.1. Origine

Le pin maritime a été planté dans les landes au 19^{ème} siècle pour fixer les dunes et dégager les marais. L'initiative, initiée par Bremonnier à la fin du 17^{ème} siècle, a ensuite été soutenue par une loi promulguée par Napoléon III, obligeant les communes à reboiser leurs zones "vacants", entraînant une augmentation de la superficie forestière des Landes de Gascogne par plus d'un million d'hectares au début du XX^{ème} siècle. (**Aubert, 2005**)

Les pins maritimes sont également utilisés pour le reboisement dans diverses régions du monde : on les trouve en Australie, au Chili, en Afrique du Sud et en Nouvelle-Zélande, selon l'importance de la surface plantée.

I.2.2. Répartition

Le pin maritime est une espèce de méditerranée occidentale liée à l'océan atlantique, avec un air de répartition naturelle s'étendant dans la péninsule Ibérique, la France, l'Italie, le Maroc, l'Algérie, et la Tunisie (**Siegue, 1985**).

C'est donc une zone très vaste et très différente en termes de conditions pédologiques et climatiques. Ses superficies sont très dispersées et se répartissent comme suit :

a- Afrique du Nord (au Maghreb)

Il occupe 28 000 hectares dont:

- **Algérie:** Estimé à 12000 hectares, selon Bensaid, (1981), limité à la zone côtière au sud de Bejaia (forêt de Beni Mimoun), zone de Cala (forêt de Bougarouni), Annaba (forêt de Bouchie de Belle) à chêne liège, à Jijel (forêt de Sanhadja), Grande Kabylie (forêt de Hamendas). Également disponible à Guelma, Tlemcen et l'Atlas Blidéen. (**Becker et al., 1983**)
- **Tunisie:** Environ 2000 hectares (forêt de Bac couche), en bordure méditerranéenne des monts Kroumir. (**Becker et al., 1983**)
- **Maroc :** les pins maritimes sont répartis dans l'ouest du Rif et dans le haut moyen de l'Atlas, couvrant une superficie de 14 000 hectares. (**Becker et al., 1983**)

b- Europe:

Principalement à l'ouest; au Portugal, en Espagne, en Corse, et dans le sud - ouest de la France, en Italie, surtout en Sardaigne et en Sicile, il occupe 1 260 000 hectares en Espagne. Au Portugal, il s'étend à 1 300 000 hectares .et 1 000 000 hectares en France (**Seigue, 1985**).

c- Dans le monde

Les *Pins maritimes* moins résistants ; Chili 10 000 hectares, Australie Occidentale 50 000 hectares, Afrique du sud 40 000 hectares, Argentine, Nouvelle-Zélande 3000 hectares. Et en Grèce 10000 hectares (**Bccker et al. 1983**)

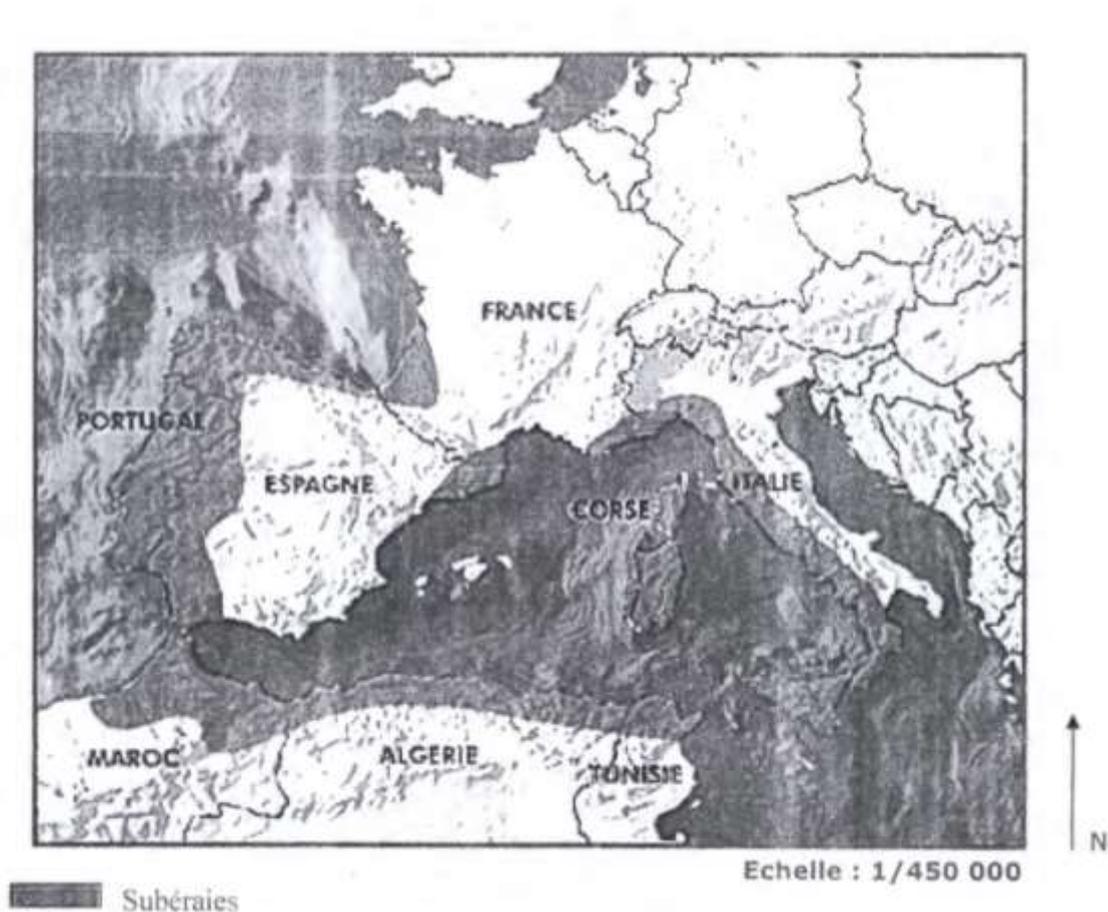


Figure 2 : Distribution du chêneliège dans son aire géographique méditerranéenne et atlantique (Zeraia, 1981)

I.3. Nom vernaculaire

Nom anglais : *Maritime pine*

Nom français : *Pin maritime*

Nom espagnole : *Pinomaritimo*

Nom portugais : *Pinhomarítimo*

Nom arabe : *الصنوبر البحري*

Nom Berbère : *Tagda*

- **Pinaster :** ou "pin sauvage" dans l'Italie latine
- **Maritime:** très adapté à un climat doux et humide. (Allissar, 2006)

I.4. Classification

D'après Emberger (1960), le classement du pin maritime (*Pinus Pinastre*) s'organise comme suit :

Tableau 1 : Classification de pin maritime

Embranchement	<i>Gymnospermes</i>
Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Pinophyta</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinales</i>
Famille	<i>Pinaceae</i>
Sous-famille	<i>Pinoideae</i>
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinuspinaster</i>

Les recherches sur la croissance, la forme, l'écophysiologie et les gènes marqueurs ont conduit à distinguer 5 grandes races géographiques :

- ✓ Race géographique du Maghreb : Algérie, Tunisie, Maroc
- ✓ Race géographique méditerranéenne continentale : Espagne de l'Est et du sud, Alpes-Maritimes, Italie
- ✓ Race géographique Corse
- ✓ Race géographique Ibérique Nord – Ouest (Portugal, Vieille Castille, Galice).
- ✓ Race géographique Landaise (5) (Mahjoub Araïbi et Kherafa, 2019)

I.5. Description

Le port et taille

Les ports sont réguliers et élancés, les feuilles claires et pyramidales lorsqu'elles sont jeunes et en forme de parasols ou de cloches lorsqu'elles sont âgées (Seigue, 1985). C'est une espèce à feuilles persistantes allogénique qui occupent la Méditerranée occidentale avec des parents atlantiques. (Anonyme., 1987)

Feuillage

Le pin maritime est un pin très long à deux feuilles. Ces feuilles forment des aiguilles allongées, de 15 à 25 cm de long, fermes ~ peu épineuses, de 2 à 2,5 cm d'épaisseur. La couleur est vert foncé de longue durée et a des pores des deux côtés. (Djamaa et moumni.2008)

Écorce

Gris pâle chez les sujets jeunes, devenant rouge avec l'âge puis noir rougeâtre. Épaisse, se crevasse avec les années et les racines forment de grandes écailles.



Figure 3 : Feuilles et écorce de *Pinus pinaster*

Le tronc

Flexible, avec une courbure dans différentes directions.

Les fleurs

La période de floraison du pin maritime se situe en avril et en mai. A l'âge de 7-8 ans, le pin maritime commence à fleurir et dure plus ou moins toute une vie. (Mauge, 1987)



Figure 4 : Fleure de *Pinus pinaster*

Bourgeons :

Non résinés, ils sont ovales avec des extrémités courtes et des poils blancs (Seigue, 1985).



Figure 5 : Le bourgeon de pin maritime

Les fruits :

Les fruits sont de très gros cônes (10-18 cm de long).



Figure 6 : Le fruit de *Pin maritime*

Les grains :

Les granules du pin maritime (*Pinus pinastre Ait.*) sont allongées de 7 à 9 mm, (noires et brillantes sur un peu grise a l'autre), ont une aile grisâtre, les ailes permettent la dispersion des grains par le vent.(Seigue, 1985)



Figure 7 : Les grains de pin maritime

II. Utilisation de *Pinus pinaster***II.1. Utilisation thérapeutique**

Les extraits d'écorce de *P. pinaster* contiennent un mélange d'un grand nombre de substances utilisées pour traiter un large éventail de maladies dégénératives grâce à leurs propriétés antioxydants, anti-inflammatoires, anti tumorales, antiathérogènes, antivirales et antimicrobiennes.(Belksir et Ferdi.2021)

Aux États-Unis, les Indiens locaux utilisaient l'extrait d'écorce de pin maritime pour traiter les plaies enflammées ou les ulcères. (Yougken, 1924; Chandler et al., 1979).

Plus tard, au cours de l'hiver 1534, l'équipage de l'explorateur français Jacques Cartier découvrit que la décoction d'écorce de pin maritime était efficace pour prévenir le scorbut causé par une carence en vitamine C. (Maimoona et al. 2011).

En cas de maladie de la peau, l'écorce de pin est considérée comme utile pour la cicatrisation des plaies. . (Arab, S.Ouchichi, T.2018)

II.1.1. Utilisation diabétique et Activité anti-inflammatoire

L'utilisation des extraits d'écorce de pin maritime comme source de bienfaits pour la santé remonte à Hippocrate le « Père de la Médecine », qui mentionnait leurs effets thérapeutiques sur les maladies inflammatoires et le diabète. **(Packer et al., 1999).**

Dans une étude sur des rats diabétiques, le traitement à l'extrait d'écorce de pin (PBE) a inhibé la formation de cataractes chez les patients diabétiques. Le PBE est également considéré comme un médicament et un traitement hypoglycémiant. Le PBE n'a eu aucun effet sur la sécrétion d'insuline, mais grâce aux proanthocyanidines (flavonoïdes), il inhibe la synthèse de l'alpha-glucosidase (une enzyme intestinale impliquée dans la digestion des glucides). **(Arabe.Ouchichi.2018)**

Des effets anti-inflammatoires et des réductions des symptômes d'hyperactivité chez les enfants ont été notés chez les asthmatiques. Ces extraits agissent également sur les troubles neurodégénératives **(Rohdewald, 2002).**

Ils protègent les cellules neurales de la toxicité induite par la bêta-amyloïde ou le glutamate, de la perte d'histamine libérée par les mastocytes et de l'inhibition des effets des cytokines pro-inflammatoires **(Peng et al., 2002 ;Blazso et al., 2004)**

II.1.2. L'activité anti-oxydante

L'extrait d'écorce de pin marin contient des niveaux élevés de flavonoïdes et de procyanidines. Ces extraits ont des propriétés antioxydantes **(Celhay, 2013)**. Les laboratoires pharmaceutiques ont utilisé l'extrait d'écorce de pin comme produit cosmétique contenant des polyphénols aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires pour lutter contre la production de radicaux libres nuisibles à la santé et à la beauté de la peau. **(Edeas,2007.)**

L'extrait d'écorce de pin marin a montré une activité antioxydante particulièrement élevée dans les tests de donneur d'hydrogène, de transfert d'électrons en solution, d'inhibition de la peroxydation lipidique en émulsion **(Tourino et al., 2005)**. L'extrait a également augmenté l'activité des antioxydants synthétiques vitamine C et Trolox dans un système modèle de peroxydation lipidique, dont l'effet dépendait de la dose et de la durée du traitement **((Belksir et Ferdi.2021)**

Le recyclage de la vitamine C par des antioxydants apportés par l'extrait d'écorce de pin maritime illustre leur effet préventif contre le scorbut.

Par conséquent, l'extrait d'écorce de pin maritime peut être utilisé comme antioxydant pour piéger les radicaux libres en excès dans de nombreuses applications agroalimentaires et pour la protection de la peau. **(Belksir et Ferdi.2021)**. De plus, plusieurs composants de l'écorce de pin maritime, tels que l'acide gallique, l'acide protocatéchique et la catéchine, sont rapidement absorbés par la peau humaine, ce qui rend l'extrait disponible pour une application topique. **(Belksir et Ferdi.2021)** D'autres propriétés découlent de cette capacité à piéger les radicaux libres, telles que l'activité cardioprotectrice, anticancéreuse et antihypertensive. **(Packer et al., 1999)**.

II.2.Utilisation pharmaceutique de pin maritime

II.2.1.Pycnogenol :

II.2.1.a.Définition :

Pycnogenol® est un extrait standardisé de l'écorce du pinuspinaster français (*Pinuspinaster* Ait.), composé de plusieurs polyphénols hydrosolubles tels que la catéchine, la taxifoline et l'acide carbonique phénolique. Et se compose également de bioflavonoïdes qui améliorent la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) endothélial et inhibent sa dégradation. **(Arab et Ouchichi, 2018)**

II.2.1.b.Effet sur la santé :

- Le PYC a des avantages cardiovasculaires tels que l'activité vasodilatatrice, l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). **(Rohdewald P.2002.)**
- La capacité à inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine est associée à de légers effets antihypertenseurs. **(Rohdewald P.2002.)**
- Il contient des composés qui ont une variété d'effets protecteurs potentiels contre les maladies chroniques liées à l'âge telles que l'athérosclérose et les conséquences cardiovasculaires de cette maladie. **(Packer .L et al .1999)**
- Utilisation comme agent antibactérien contre divers micro-organismes pathogènes procaryotes (Gram + et -) et eucaryotes tels que les levures et les champignons, **(Torras et al.,2005) .**

- Il est utilisé comme phytothérapie nutritionnelle et complément alimentaire pour de nombreuses maladies dégénératives. (**Arab et Ouchichi, 2018**)
- Cet extrait est pris pour son effet hypocholestérolémiant. (**Henni et Chekoufi, 2020**)
- De plus, il prévient l'érythème causé par les rayons UV après la prise de ce médicament par voie orale. (**Arab, Ouchichi, 2018**)

II.2.1.c. Effet sur le sang

- Capacité à améliorer la microcirculation en augmentant la perméabilité capillaire. (**Packer et al 1999**)
- Des études cliniques ont montré que le PYC est efficace dans le traitement de l'insuffisance veineuse chronique et des microhémorragies rétinienne. (**Rohdewald P. 2002.**)
- Cette thérapie prévient l'agrégation plaquettaire causée par le tabagisme et réduit les concentrations de thromboxane. (**Henni et Chekoufi, 2020**)
- Il a également la capacité d'accélérer le processus de cicatrisation et d'inhiber les effets pro-inflammatoires des cytokines. (**Henni et Chekoufi, 2020**)
- Le PYC soulage les symptômes prémenstruels, y compris les douleurs abdominales, qui peuvent être liés aux effets spasmolytiques de certains acides phénoliques. (**Rohdewald P. 2002.**)

II.2.1.d. Toxicité:

Le PYC a une faible toxicité aiguë et chronique, avec de légers effets indésirables survenant chez un petit sous-groupe de patients après administration orale. (**Rohdewald P. 2002.**)



Figure 8 : LePycnogenol

III. Toxicité de pin maritime

L'exposition des plantes à des facteurs de stress abiotiques et biotiques augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), entraînant un stress oxydatif.

Pour prévenir les dommages oxydatifs, les plantes disposent de systèmes antioxydants qui contrôlent la production de ROS pendant les périodes de stress. Le chancre du pin est causé par *Fusariumsphaeroides*, un champignon envahissant en Europe très virulent contre plusieurs espèces de pins.

Depuis 2003, des efforts ont été faits pour contrôler la maladie et réduire ses effets destructeurs, en sélectionnant des espèces résistantes et des clones de *P. pinaster*. (**Vivas et al. 2014**).

Chapitre III
Matériel et méthodes

I. Matériels

I.1. Matériels biologique :

Le matériel expérimental et les réactifs utilisés durant le travail pratique sont rapportés en (Annexe1).

I.2. Matériel microbiologique :

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits de *Pinuspinaster*, deux souches bactériennes provenant du laboratoire de microbiologie de l'université de Bouira sont utilisées :

Famille	Souches	Gram	Caractéristique
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Cocci ubiquitaire, commensal de l'homme, Responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	-	Bactérie de sol en forme de bâtonnet, elle est pathogène opportuniste avec une résistance innée aux antibiotiques. elle provoquant des infections systémiques telles que l'infection de sang et la pneumonie

I.3. Matériels végétal :

Cette étude a été réalisée sur les feuilles vertes, feuilles séchées et l'écorce de *Pinuspinaster*.

Les échantillons ont été cueillis le 17 avril 2022 de la forêt de Jijel.

II. Méthodes :

II.1. Préparation de matériel végétal

II.1.1. Séchage :

Les écorces de pin maritime ont été séchées à l'aire libre dans le laboratoire pendant une semaine.

Par contre les feuilles ont été séchées à l'étuve au niveau de laboratoire microbiologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, à l'université de Bouira, pendant 3 jours à 37°C.

II.1.2. Broyage :

Les échantillons obtenus par les séchages ont immédiatement été broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Puis sont tamisées dans le but de récupérer une poudre plus fine, par contre les feuilles vertes ont été coupées en petit morceaux à l'aide d'un ciseau. Les poudres obtenues ont été mises dans des flacons fermés, étiquetés et conservés à l'abri de la lumière (température ambiante à 25°C)



Figure 9 : Les poudres de l'écorce et des feuilles séchées de *Pinus pinaster*

II.2. préparation des extraits bruts :

Les extraits utilisés au cours de notre étude sont préparés selon le mode d'extraction: macération

II.2.1. Extraction éthanolique (EE) :

Principe :

L'extraction consiste à mettre en contact le matériel végétal avec un solvant à température ambiante ou à température élevée, avec ou sans agitation, pendant une période de temps spécifiée. Cette technologie est basée sur la solubilité des composés biologiquement actifs dans le solvant d'extraction et il est affecté par une série de facteurs, notamment la nature du matériel végétal, la concentration en soluté de l'échantillon, la nature du solvant et la durée d'extraction. (Benane et Akkouche.2021)

Protocole :

L'extraction est faite selon le protocole décrite par BOLOU et al. (2011) avec quelques modifications :

- Une masse de 30 g de poudre végétale a été ajoutée à 450 ml d'éthanol 96%
- macération à température ambiante pendant 72h, avec une agitation, pendant 1h
- le macérât est filtré sur papier filtre
- Après filtration, le solvant est évaporé à sec et sous vide à l'évaporateur rotatif à 40 °C.
- En suite les extraits obtenues sont laissés à l'air libre pour sécher pendant 48h.
- Les produits obtenus après séchage des filtrats des trois extractions, constituent l'extrait brut, ils sont conservés au réfrigérateur à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.



Pesée des échantillons



échantillon en étape de macération



Echantillons au cours de filtration



Echantions après filtration



Séchage a l'évaporateur rotatif

Figure 10 : Procédure d'extraction

II.3.Méthodes analytique

II.3.1.Calcul de rendement

La mesure d'un rendement de l'extrait (R) est une étape très importante pour savoir la quantité et le pourcentage d'extrait obtenus par une extraction. Ce rendement est le rapport entre le poids de l'extrait sec (après l'évaporation) exprimé en g et le poids de l'échantillon initial (poudre végétale en g). (Belksir et Ferdi.2021)

Le pourcentage de rendement pour chaque extrait a été calculé par la formule suivante:

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter



Figure 11 : Image représente le poids des 3 extraits

II.3.2. Dosage des polyphénols

Principe

En principe la détermination des polyphénols totaux est basée sur la méthode de FolinCiocalteu qui est un réactif constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀)

Il sera réduit en milieu alcalin par les polyphénols, donnant un mélange d'oxyde bleu tungungstène et de molybdène

La coloration bleu produite dont l'absorption maximum à 765 nm est proportionnelle a la quantité des polyphénols présents dans les extraits obtenus. **(Boizotet Charpentier., 2006).**

Protocole

➤ **Préparation de la solution mère**

4mg de l'extrait dans 4ml d'éthanol (400 mg/ml)

➤ **Préparation des délutions**

Dilution 1 : 2 ml de la solution mère dans 2 ml d'éthanol (200mg/ml)

Dilutions 2 : 2ml de D1 dans 2 ml d'éthanol (100mg/ml)

Dilution 3 : 2ml de D2 dans 2 ml d'éthanol (50mg/ml)

➤ **Procédure de dosage**

Dosage des polyphénols dans les différents extraits est réalisé par la méthode décrite par **Georgéet al.,(2005).**

Un volume de 500 µl de chaque extrait éthanolique est met dans des tubes a essais ,puis 2,5 ml de réactif de Folincioalceu dilué à 1/10 (**Annexe 4**) a été ajouté dans chaque tubes , Le mélange est incubé pendant 2 min à température ambiante, en suite 2 ml de carbonate de sodium (75 g/l) (**Annexe 4**) sont ajouté. Le mélange est incubé 15 min.

Les essais sont reproduits trois fois.et l'absorbance est lue à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (SpectroScan UV Visible). La concentration en composés phénoliques est exprimée en mg équivalent de l'acide gallique par g (mg Eq AG/g) en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique.

La teneur en composés phénoliques des échantillons analysés est calculée par la formule :

$$\text{TCP} = \text{C} \cdot \text{V} / \text{m}$$

C: Concentration de l'extrait (mg EAG/g) ;

V: Volume de solvant utilisé pour l'extraction (ml) ;

m: Masse en grammes de la prise d'essai (g).

➤ **La gamme d'étalonnage de l'acide gallique**

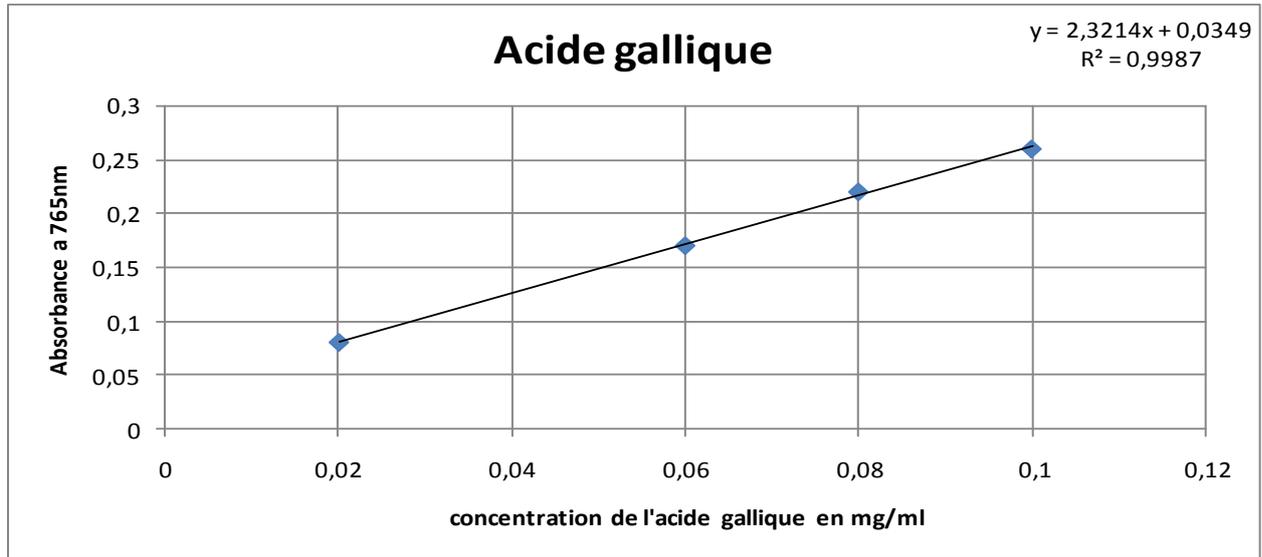


Figure 12 : Courbe d'étalonnage du standard acide gallique utilisé dans le dosage des polyphénols totaux

II.3.3. Dosage des Flavonoïdes

Principe

Le dosage des flavonoïdes est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl₃).

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Lagnika, 2005).

Protocole

➤ **Préparation de la solution mère**

4mg de l'extrait dans 4ml d'éthanol

➤ **Préparation de la dilution**

Dilution 1 : 2ml de SM dans 2 ml d'éthanol

➤ **Procédure de dosage**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode de **Djeridane et al. (2006)** avec le trichlorure d'aluminium (AlCl₃).

Un volume de 1 ml d'extrait est mélangé avec 1 ml de la solution de trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Après incubation 10 min à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de Quercétine par g de matière sèche, en se référant à la courbe d'étalonnage de la Quercétine. L'expérience a été faite en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type.

La teneur en flavonoïdes des échantillons analysés est calculée par la formule (2) :

$$TF = C \cdot V / m \quad (2)$$

C: Concentration de l'extrait (mg EQ/ g)

V: Volume de solvant utilisé pour l'extraction (ml);

m: Masse en grammes de la prise d'essai (g).

➤ **La gamme d'étalonnage de la Quercétine :**

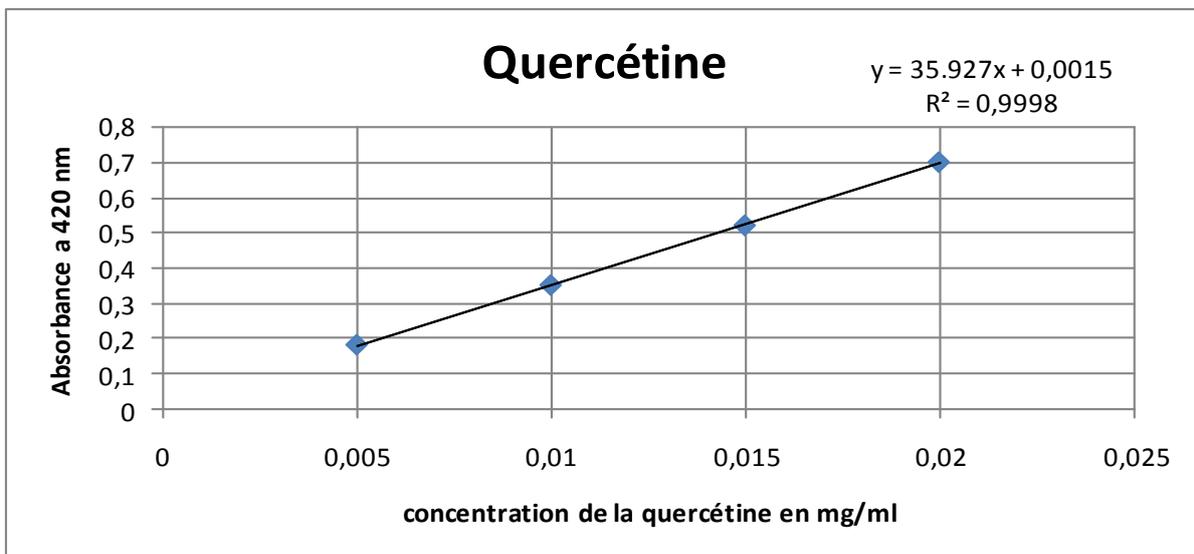


Figure 13 : Courbe d'étalonnage du standard Quercétine utilisé dans le dosage des flavonoïdes

II.3.4. Activité anti oxydante

Principe

La méthode de DPPH est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène ou d'électrons (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire, le DPPH-H. La solution initiale de DPPH (forme radicalaire) possède une couleur violette avec un maximum d'absorbance à 517 nm. La réduction de cette solution entraîne la transformation de la couleur violette en couleur jaune. L'absorbance de la couleur violette restante après réduction est ainsi mesurée à 517 nm. Plus la perte de la couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort (**Belmokhtar, 2015**).

Protocole

➤ **Préparation de DPPH**

Mettre 2.3 mg de l'extrait solide dans 100 ml de l'éthanol pure (96%), agiter pendant 1h.

➤ **Préparation de la solution mère**

4 mg de l'extrait dans 4 ml d'éthanol

➤ **Préparation des dilutions**

Dilution 1 : 2 ml de SM dans 2 ml d'éthanol

Dilution 2 : 2 ml de D1 dans 2 ml d'éthanol

➤ **Procédure de dosage**

On a préparé 9 tubes pour faire 3 essais pour chaque dilution, dans chaque tubes on a met un volume de 50 ul de la solution de chaque dilution mélangé avec 1950 ul de la solution DPPH. Le mélange est incubé 15 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm. La capacité antioxydant de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

Elle est calculée par l'équation suivante :

$$I \% = (A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle} \times 10$$

A échantillon : Absorbance de l'échantillon.

A contrôle : Absorbance du contrôle négatif.

Détermination d'IC50

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité anti-oxydante (Khoudalietal;2014).

II.4. Analyses biologiques des extraits

II.4.1. Activité Anti Bactérienne :

Principe :

L'inhibition de la croissance bactérienne in vitro a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide (Basli et al.,2012) Selon Biyiti et al., (2004), un extrait est considéré comme actif s'il produit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm, lorsque la zone d'inhibition est supérieure à 5 mm, la plupart des extraits végétaux exercent une légère activité antibactérienne (Jouda et al., 2016) . Une zone d'inhibition supérieure à 14 mm correspond à une activité antibactérienne très significative (Ramzi et al.,2010)

Protocole

➤ Préparation de milieu de culture

Les milieux de cultures utilisés dans l'activité antibactérienne sont :

- Le bouillon nutritif pour préparer des cultures jeunes de 24 (annexe 4)
- La gélose Muller Hinton pour les tests antibactériens (antibiogramme). (annexe 4)

➤ Préparation des cultures jeunes

Quelques colonies bien isolées des cultures pures sont prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis mises dans 9 ml de bouillon nutritif, ont été bien homogénéisées, ensuite incubé 24h.

➤ Préparation de l'inoculum

1 ml des culture jeunes (*staphelococcus* , *pseudomonas*) ont été isolé et mises en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de (Na Cl),bien homogénéisée,puis la suspension lue avec spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 625 nm.

DO doit être entre 0,08 et 0,1

- >0.08 : ajusté en additionnant la culture bactérienne
- < 0.1 : ajusté en additionnant l'eau physiologique

➤ **Préparation des extraits aqueux**

4 g de la poudre végétale additionnés de 4ml d'éthanol, ont été mis en agitation jusqu'à la dissolution totale des extraits de la plante (*Pinus pinaster*), après la préparation des extraits, une gamme de dilution a été établie.

➤ **Préparation des dilutions**

Dilution 1 : 2 ml de SM dans 2 ml d'éthanol

Dilution 2 : 2 ml de D1 dans 2 ml d'éthanol

Dilution 3 : 2 ml de D2 dans 2 ml d'éthanol

➤ **La méthode de diffusion**

Après solidification de milieu Muller Hinton, dans une zone stérile autour autour du bec benzène, des bactéries ont étéensemencées a l'aide des écouvillons

Puis introduction de 5 puits dans chaque boîte, dont un puits est considéré comme témoin (T) qui est L'acide gallique et les 4 autres (SM, D1, D2 ,D3) représentent les différentes dilutions de l'extrait.

Ensuite on a introduit dans le premier puits (T) qui est le témoin 50ul de l'acide gallique et dans les 4 autres puits (SM,D1,D2, D3) 50ul de l'extrait.

Passer a l'incubation à 37°C pendant 24

➤ **Expression des résultats :**

La détermination de l'activité antibactérienne a été faite en mesurant le diamètre de la zone claire d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque puits où aucune croissance n'est observée.

II.4.2. Identification des Glycosides cardiaque

Protocole

2ml de chloroforme est ajouté à 1 ml de l'extrait, ensuite 1 ml d'acide sulfurique H₂SO₄ est ajouté (EL-Haoud et al .2018)



Figure 14 : Images représentant la manipulation de protocole d'identification des glycosides cardiaques

Expression des résultats

L'apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de H₂SO₄ indique la présence des glycosides cardiaques (EL-Haoud et al ;2018).

Chapitre IV

Résultats et discussion

I. Résultats de calcul du rendement pour chaque extraction

La première quantification à faire est celle du rendement de l'extrait brut des feuilles et l'écorce de *Pinuspinaster*. 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 2**.

Tableau 2 : Tableau des rendements des extraits des différentes parties de *pinuspinaster*.

	Ecorce de pinuspinaster	Feuilles vertes de pinuspinaster	Feuilles séchées de pinuspinaster
M (Masse de l'extrait sec (g))	14.1	25.18	28.72
M 0 (Masse du matériel végétal (poudre) sec (g))	30	30	30
R (Rendement d'extraction (%))	47%	83.93%	93.33%

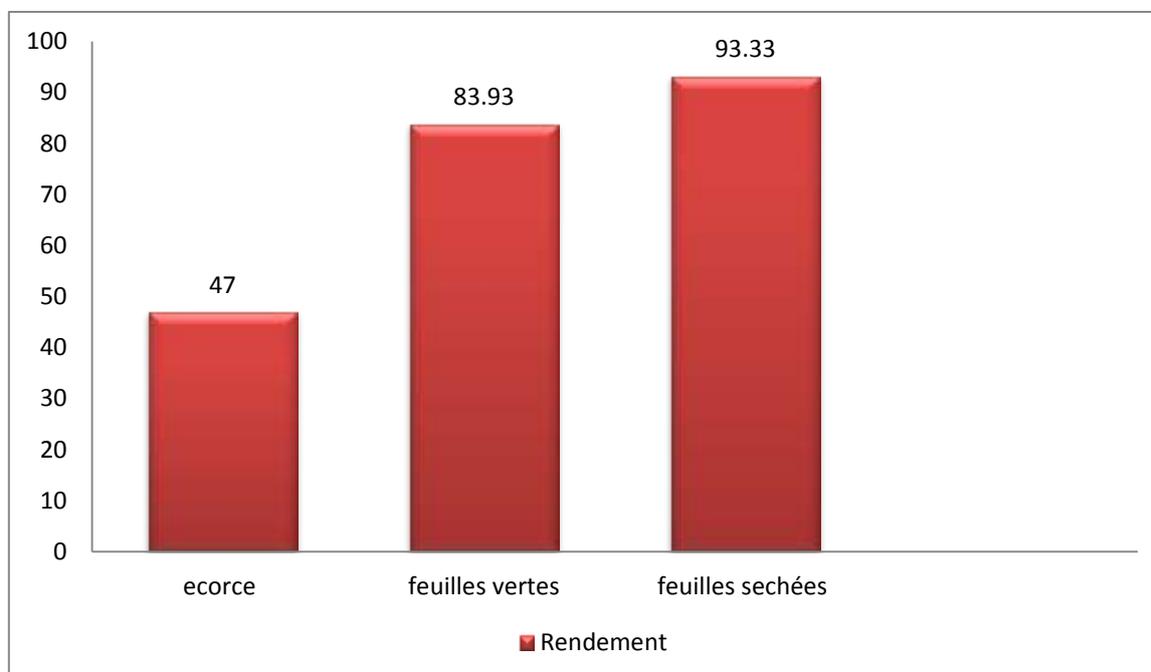


Figure 15 : Histogramme des rendements de différentes parties de *Pinuspinaster*

Les résultats obtenus montrent que le rendement le plus élevé a été obtenu chez les feuilles séchées, soit 93.33%, tandis que le rendement le plus faible est obtenu chez l'écorce, soit 47%, alors que le rendement des feuilles vertes est de 83.93 %.

Le rendement d'extraction dépend du processus utilisé, car les constituants des cellules se libèrent par rupture des parois cellulaires vers le solvant organique, un phénomène qui s'intensifie par l'usage d'un solvant polaire (Li et al., 2012). La taille des particules végétales joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques. Il est généralement admis que sous une forme broyée, la matière végétale présentera une plus grande surface de contact avec le solvant, permettant ainsi d'accélérer sa solubilité (Banouh, H et Maiz, M. 2019)

II. Résultats du Dosage des polyphénols

Dosage des polyphénols dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ces résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Les résultats du dosage sont représentés dans le **tableau 3** et sous forme d'un histogramme dans la **figure 16**

Tableau 3 : Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les extraits éthanoliques des parties de *Pinus pinaster*

Echantillons	Polyphénols
Ecorce	33.45±0.010
Feuilles vertes	9.15±0.0122
Feuilles séchées	4.65±0.022

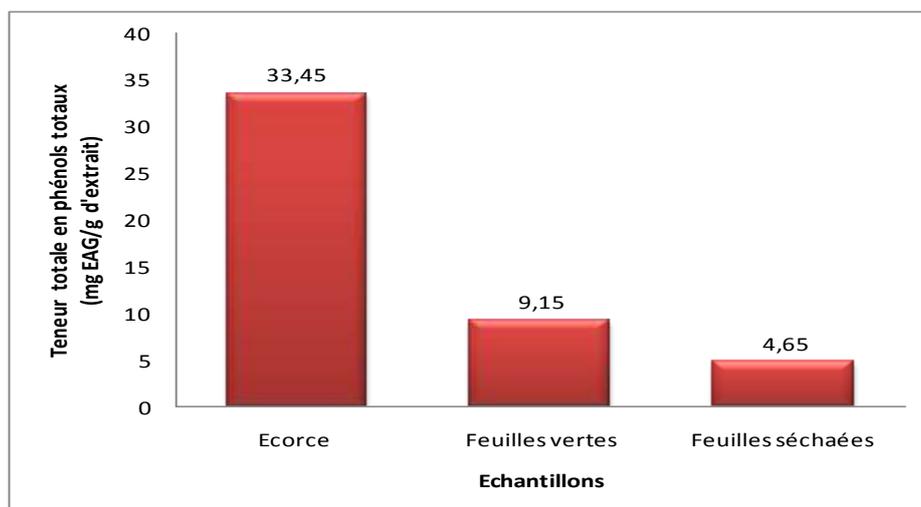


Figure 16 : Histogramme représente les teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques des parties de *Pinus pinaster*

Après exploration de cette figure, on constate que les teneurs en polyphénols totaux au niveau de l'extrait des parties de *Pinus pinaster* se révèlent que l'écorce est plus riche en composés phénoliques estimée à $(33.45 \pm 0.010 \text{ mg EAG / g d'extrait})$ suivie par la partie des feuilles vertes qui renferme $(9.15 \pm 0.0122 \text{ mg EAG/g d'extrait})$, tandis que la partie des feuilles séchées ne contient que $(4.65 \pm 0.022 \text{ mg EAG/g d'extrait})$.

Il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques avec des solvants, et le rendement de cette extraction dépend fortement de la nature du solvant, et de la méthode d'extraction, mais aussi du matériel végétal et ses composés bioactifs. Le solvant doit permettre une extraction maximale du polyphénol sans modifier leurs structures.

Plusieurs facteurs peuvent affecter la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques la maturité des plantes et le temps de stockage ont un impact important sur le contenu en polyphénols. (Banouh, H. Maiz, M. 2019)

III. Résultat du Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et l'étalon a été la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait (mg QE/g extrait). Les résultats du dosage sont représentés dans le **tableau 4** et sous forme d'un histogramme dans la **figure 17**.

Tableau 4 : Résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des parties de *Pinus pinaster*

Echantillons	Flavonoïdes
Ecorce	0.51± 0.0510
Feuilles vertes	0.23±0.0070
Feuilles séchées	0.33±0.1420

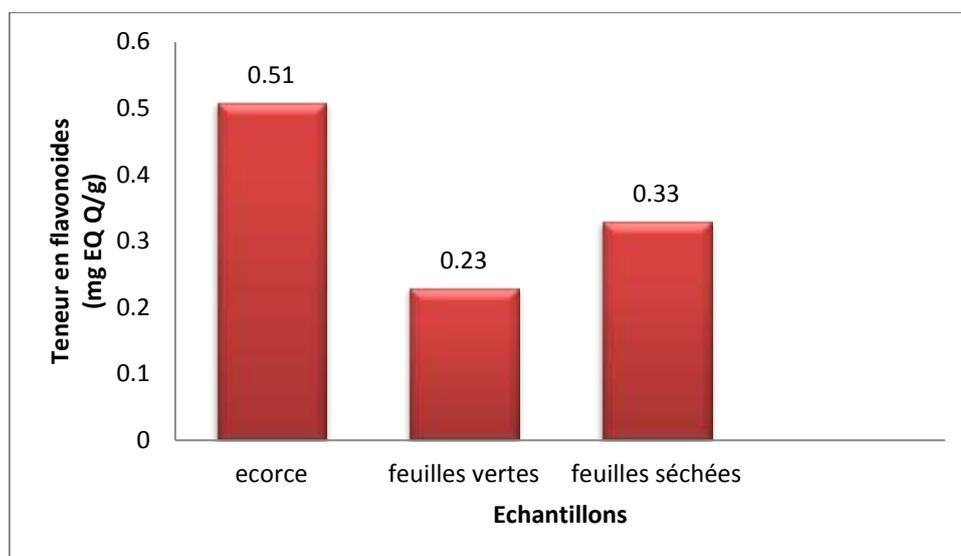


Figure 17 : Histogramme représente les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques des parties de *Pinus pinaster*

Les résultats obtenus du dosage des flavonoïdes totaux dans les extraits éthanoliques d'écorces et des feuilles vertes et séchées révèlent que la partie d'écorce est plus riche en composés flavonoidiques (0.51 ± 0.0510 mg EAG/mg d'extrait) suivie par la partie des feuilles séchées qui renferme (0.33 ± 0.1420 mg EAG/mg d'extraits), tandis que la partie des feuilles vertes ne contient que (0.230 ± 0.0070 mg EAG/ mg d'extraits).

Comme nous n'avons pas trouvé des résultats correspondant exactement à notre travail, nous ne pouvons pas discuter de nos résultats, mais si nous les comparons avec d'autres extraits, nous trouverons une différence significative.

Les flavonoïdes sont des composés naturels qui n'est pas seulement impliqué dans la pigmentation des plantes, mais qui présente également des activités biologiques telles que des effets antioxydants (Fiorucci., 2006). En présence de chlorure d'aluminium. La couleur jaune des flavonoïdes est due à la formation complexe de chlorure d'aluminium avec des atomes d'oxygène sur le carbone des flavonoïdes (Zeghad., 2009)

Les différences de la teneur en flavonoïdes sont dues peut être aux conditions de croissance de la plante, comme le sol, le lieu géographique, conditions ambiantes pendant le développement de l'organe, degré de maturité, la moisson et les différences génétiques. (Banouh, H. Maiz, M. 2019)

IV. Résultat de l'activité antioxydante

IV.1. teste de DPPH

L'activité anti-oxydante des extraits de *Pinus pinaster* vis-à-vis le radical DPPH a été évalué avec un spectrophotomètre à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Les résultats qui représentent les profils de l'activité anti-oxydante obtenus pour les différents extraits de *Pinus pinaster* sont représentés dans les tableaux et sous forme de courbe dans les figures ci-dessous

Tableau 5 : Résultats de l'activité anti-oxydante obtenus pour l'extrait d'écorce de *Pinus pinaster*

Dilutions	Concentrations(mg/ml)	Absorbances(nm)	I%
SM	400	0.316	64.61
D1	200	0.329	63.15
D2	100	0.406	54.53

DPPH : 0.701 nm

Contrôle : 0.893 nm

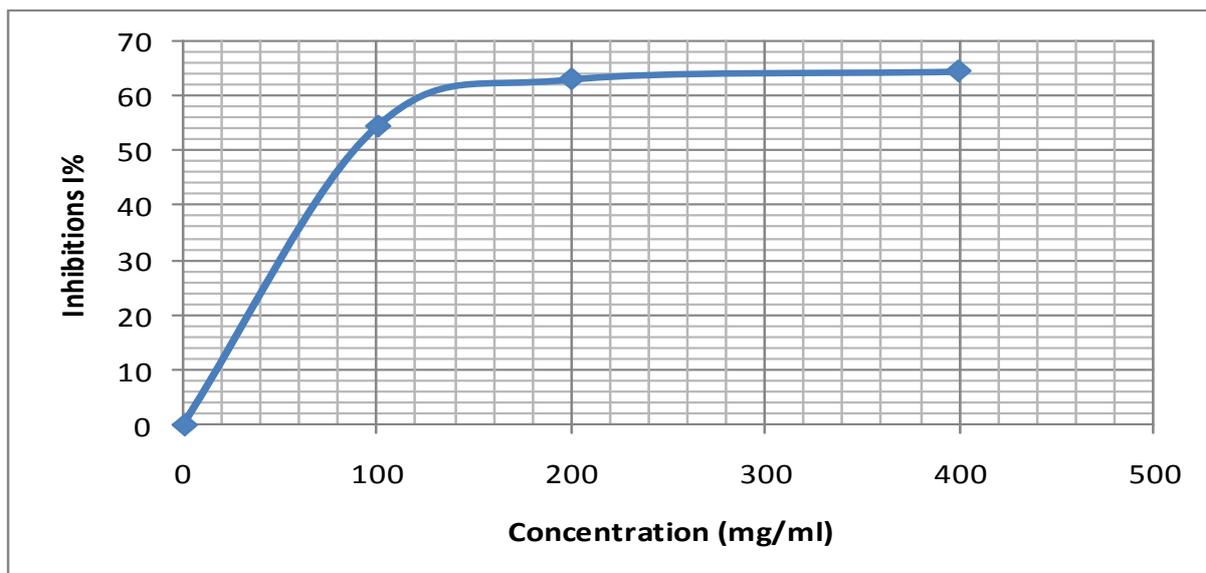


Figure 18 : Profils de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique d'écorce de *Pinus pinaster*

Tableau 6 : Résultats de l'activité antioxydante obtenus pour l'extrait des feuilles vertes de *Pinus pinaster*

Dilutions	Concentrations (mg/ml)	Absorbances (nm)	I%
SM	400	0.325	63.61
D1	200	0.530	40.65
D2	100	0.569	36.28

DPPH : 0.701 nm

Contrôle : 0.893 nm

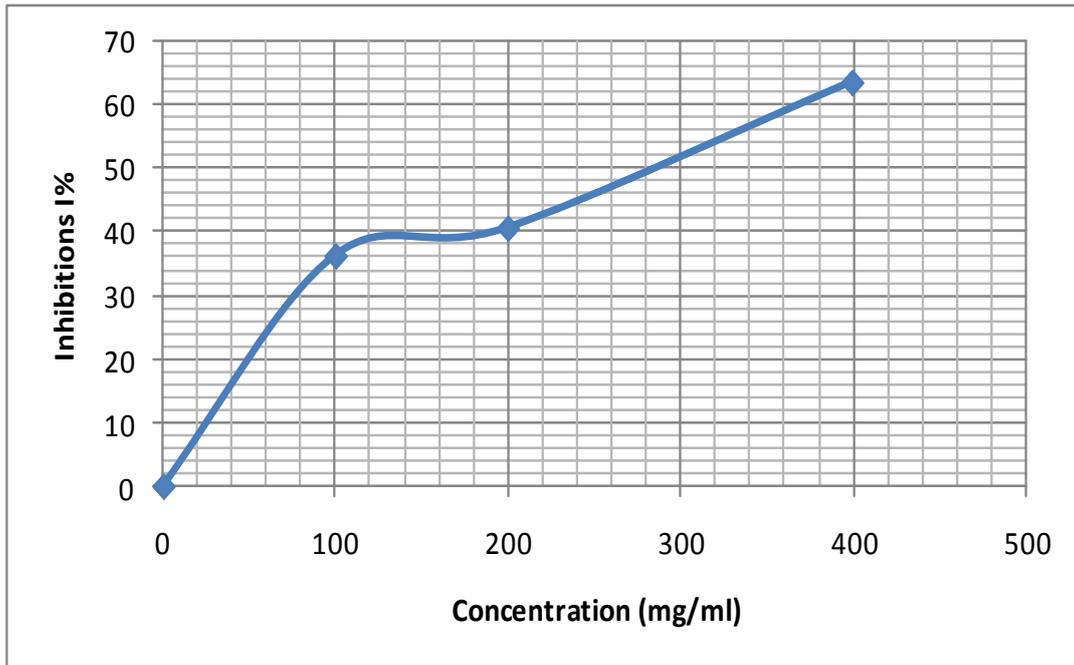


Figure 19 : Profils de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des feuilles vertes de *Pinuspinaster*

Tableau 7 : Résultats de l'activité antioxydante obtenus pour l'extrait des feuilles séchées de *Pinuspinaster*

Dilutions	Concentrations (mg/ml)	Absorbances (nm)	I%
SM	400	0.430	51.84
D1	200	0.587	34.27
D2	100	0.633	29.12

DPPH :0.701 nm

Contrôle :0.893 nm

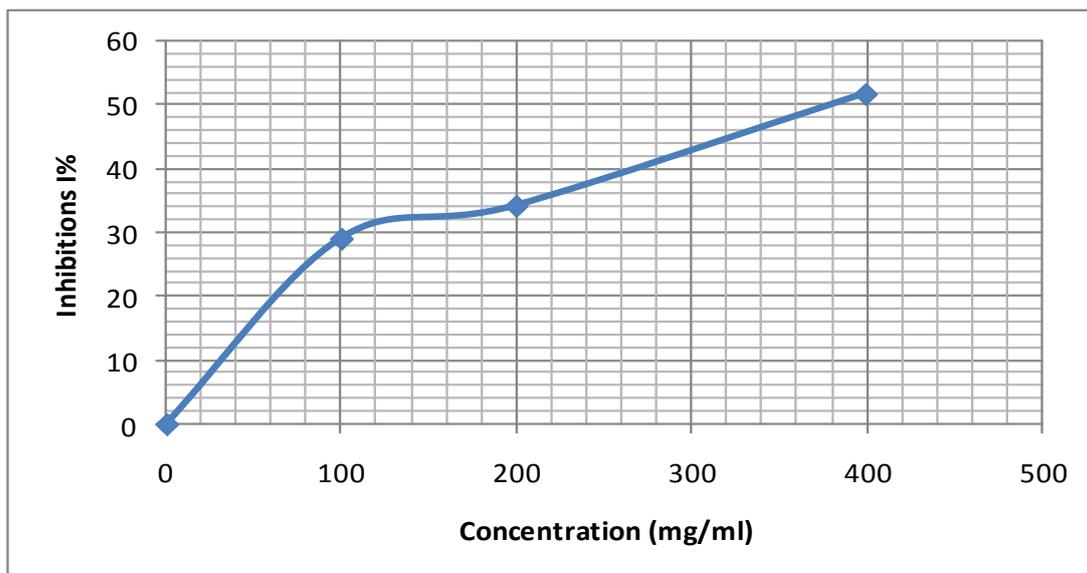


Figure 20 : Profils de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des feuilles séchées de *Pinus pinaster*

IV.4.2. Calculs d'IC₅₀ dans les différentes parties de *Pinus pinaster*

L'activité anti-radicalaire est exprimée en concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀), qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire le 50 % du DPPH. Plus la IC₅₀ est faible, plus l'antioxydant est efficace.

Les résultats de l'activité anti-radicalaire au DPPH des aqueux de l'écorce de *Pinus pinaster* sont représentés dans la **figure 21**

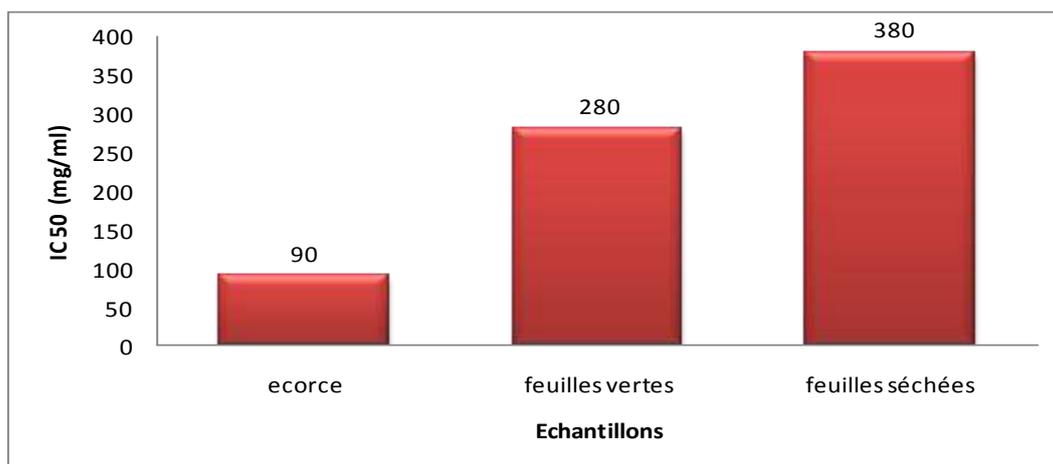


Figure 21 : Histogramme représente les IC 50 des 3 extraits éthanoliques

Les résultats obtenus par les extraits éthanoliques montrent que l'écorce a une activité antioxydante plus importante que celle des feuilles vertes et des feuilles séchées avec une IC50 égale 90mg/ml, suivie par les feuilles vertes avec une IC50 égale 280 mg/ml et finalement par les feuilles séchées avec une IC50 égale 380 mg/ml .

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues par **Pedro Ferreira-Santos et al. (2020)** montrent une activité anti-radicalaire considérable dans l'extrait d'écorce de *Pinuspinaster* avec des IC50 de l'ordre de $99,96 \pm 0,1\mu\text{g/ml}$. Équivalente à celle trouvée dans notre étude.

Les composés phénoliques semblent être responsables de l'activité antioxydante de cette espèce en raison de la présence d'un grand nombre de groupements hydroxyle pouvant réagir avec les radicaux libres (**Klervi, 2005 ; Panovska, 2005 ; Sokol, 2007**). De nombreuses études ont établi une relation entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité antioxydante. L'activité de ces molécules à captées les radicaux libres dépendent principalement de leur structure. (**Amic et al., 2003 ; Marfak, 2003 ; Sokol, 2007**).

V. l'activité antibactérienne

Il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Mais, la consommation à grande échelle de ces « médicaments » a entraîné la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouveaux substituts, surtout les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration dans les recherches médicales (Arab et Ouchichi2018).

V.1.Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *Pinuspinaster*

L'objectif de ce travail est de déterminer parmi les extraits préparés ceux qui avaient la plus grande activité inhibitrice des bactéries à gram-positif (*staphylococcus aureus*), des bactéries à gram-négatif (*pseudomonas*).

➤ Méthode de diffusion en puits

Les diamètres des zones d'inhibition induits par les différentes dilutions des extraits éthanoliques préparés à partir des feuillesvertes, feuilles séchées et l'écorce de *Pinuspinaster* sur la croissance des souches bactériennes testées sont consignés dans **les tableaux** et représentés par les **figures**.

- **Activité antibactérienne des extraits sur *Staphylococcus aureus***

Tableau 8 : Effet inhibiteur des extraits des feuilles vertes et séchées et de l'écorce sur la culture de *Staphylococcus*

Diamètre d'inhibition (mm)			
	Ecorce	Feuilles vertes	Feuilles séchées
SM	15	12	11
D1	12	11	10
D2	10	11	10
D3	09	10	09
Moyenne	11.5	11	10

SM : la solution mère ; D1.2.3 : les dilutions ;

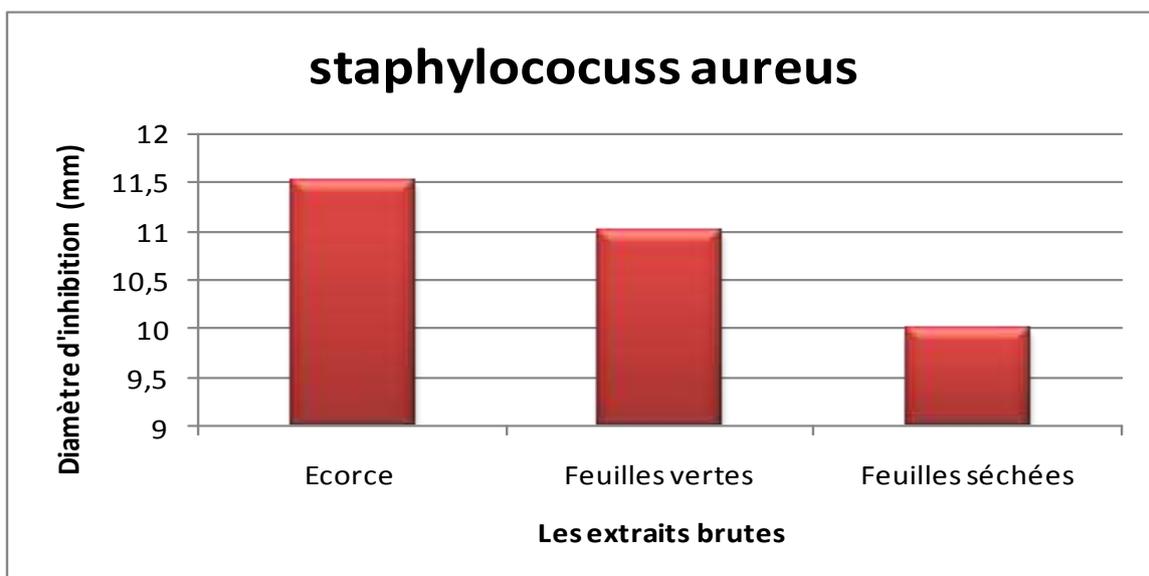


Figure 22 : Histogramme représente l'effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur la culture de *Staphylococuss aureus*

En présence des extraits dilués des parties de *Pinus pinaster*, *Staphylococuss aureus* a développé des diamètres d'inhibition de 11.5 mm, 11 mm et 10 mm respectivement (**Figure 23**)



Figure 23 : image des zones d'inhibition des trois extrais sur staphylococuss aureus

- **Activité antibactérienne des extraits sur *Pseudomonas***

Tableau 9 : Effet inhibiteur des extraits sur *Pseudomonass*

	Diamètre d'inhibition (mm)		
	Ecorce	Feuilles vertes	Feuilles séchées
SM	13	13	12
D1	12	13	10
D2	10	11	08
D3	7	10	07
MOYENNE	10.5	11.75	9.25

SM : la solution mere ;D1.2.3 : les dilutions .

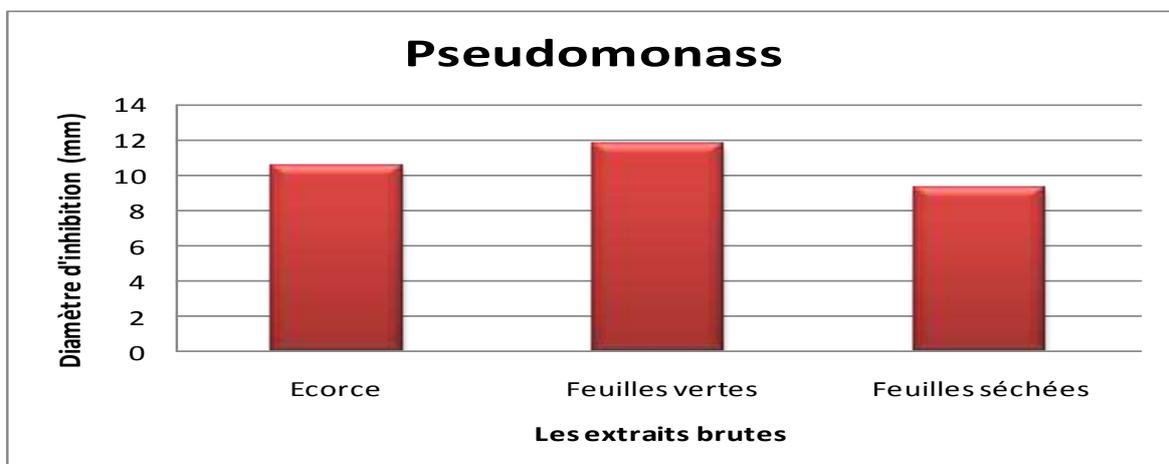


Figure 24 : Histogramme représente l'effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur la culture de *Pseudomonass*

En présence des extraits dilués des parties de *Pinus pinaster*, *Pseudomonas* a développé des diamètres d'inhibition de 10.5mm, 11.75mm et 9.25 mm respectivement (**Figure 25**)



Figure 25 : Image des zones d'inhibition des trois extraits sur *Pseudomonas*

Il est connu que les différents extraits de l'écorce du pin maritime « *Pinus pinaster* » présentent une activité antimicrobienne importante. Ceci a été démontré, par recherches, y compris les travaux de (**Torras, 2005**) sur l'activité antimicrobienne du Pycnogenol®,

Ces deux souches microbiennes se sont révélées faibles aux extraits testés avec une zone d'inhibition supérieure à 10ème. Équivalent à l'étude de **Kahlouche-Riachi** effectué en 2014, sur l'effet antibactérien de l'extrait hydro-éthanolique de l'écorce du *Pin maritime* sur la même souche (*Staphylococcus aureus*) a observé un effet antibactérien considérable (DI=14.33).

Pour les *Pseudomonas* comme nous n'avons pas trouvé de résultats correspondants, nous ne pouvons pas les discuter.

L'extrait d'écorce de PPI posséderait des propriétés antibactériennes contre les Gram+ et – (**KahloucheRiachiFoulla .2013.**).

L'activité antibactérienne des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (**KahloucheRiachiFoulla .2013.**).

Nos extraits ont été tous trouvés contenir une quantité de flavonoïde plus ou moins importante, donc on peut dire que l'activité antibactérienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence de ce type de composés chimiques actifs dans leur composition. (**KahloucheRiachiFoulla .2013.**).

VI. Résultat de l'identification des Glycosides cardiaque

Les glycosides cardiaques (GCs) utilisés en clinique contre les maladies cardiaques sont des inhibiteurs de la pompe sodium-potassium-ATPase. Récemment il a été montré que ces composés ont un effet anti-cancéreux. L'apparition de la couleur brun-rougeâtre signifie la présence de glycosides cardiaques.



Figure 26 : Image représente l'apparition des glycosides cardiaque dans l'écorce de *Pinuspinaster*

	Apparition de la couleur brun-rougeâtre	Absence de la couleur brun-rougeâtre
Ecorce	+	
Feuilles vertes		+
Feuilles séchées		+

De ces résultats, nous concluons que les glycosides cardiaque ne se trouvent que dans l'écorce et sont absents dans les feuilles vertes et séchées.

Cependant, ces données sont encore préliminaires, elles doivent donc être approfondies par exemple en essayant d'autres protocoles et en utilisant d'autres solvants organiques.

Conclusion

Conclusion

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydant et antibactérienne des extraits éthanoliques obtenu par macération de trois parties de plante de pinuspinaster(écorce. feuilles séchés. feuilles vertes).

La comparaison des extraits selon leurs rendements a fait ressortir que l'extrait éthanoliques des feuilles séchés est plus élevé que des feuilles vertes et l'écorce.

Les résultats obtenus dans l'analyse quantitative des composés phénoliques nous ont permis de déduire que les trois parties de la plantes sont une source prometteuse et riche de polyphénols. La distribution de la teneur en polyphénols totaux entre les différentes parties est importante et légèrement différente d'un extrait à l'autre. Parallèlement, la teneur en flavonoïdes est inférieure à celle des polyphénols existants dans ces extraits étudiés. En conséquence, la quantité des composés phénoliques présente dans la plante constitue un index sur lequel nous pouvons nous appuyer pour l'étude phytochimique.

L'évaluation de l'activité antioxydant in vitro des extraits a été réalisée par la méthodes du radical libre DPPH. Nous avons constaté que les différents extraits bruts testés présentent des activités antiradicalaires et antioxydants intéressantes, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et une relation linéaire a été établie entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité antioxydant.

Les extraits de cette plante ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antibactérienne in vitro, contre deux souches bactériennes, en employant la méthode de diffusion en puits.

Nous avons constaté que les extraits éthanolique de la plante possèderaient des propriétés antibactériennes contre les Gram+ et – (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonass*).

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les glycosides cardiaques qui ont de grandes valeurs thérapeutiques. Cependant, ces données sont encore préliminaires, elles doivent donc être approfondies par exemple en essayant d'autres protocoles et en utilisant d'autres solvants organiques.

Références
Bibliographiques

- Amic, D., Davidovic, A.D., Beslo, D., Trinajstic, N., 2003.** "Structure radical scavenging activity relationships of flavonoïdes". *CroaticaChemical Acta*, 76: 55-61.
- Anonyme., (1987)** : le pin maritime (*Pinus pinaster* L.) .Ed .Cemagref de Grenoble .p4
- Arab, S., Ouchichi, T., 2018.** Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait de l'écorce de *Pinus pinaster*. Mémoire. Physiologie cellulaire et physiopathologie. Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira, Algérie.
- Aubert G., (2005)** : dynamique des peuplements de pin maritime en région méditerranéenne française, forêt méditerranéenne. XXVI. N°1. PP37-47
- Banouh, H., Maiz, M., 2019.** *Evaluation in vitro de l'activité antilithiasique des extraits des feuilles et des fleurs de Paronychia argentea, plante utilisée en médecine traditionnelle en Algérie.* Mémoire. *Biochimie Appliquée*. Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira, Algérie.
- Basli, A., Chibane, M., Madani, K., Oukil, N., 2012.** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* 10, 2–9
- Becker M.J et Pical F. et Timbal J., (1983):** les arbres, chérie liège. Ed .Masson paris - new - York, p82
- Belksir, D., Ferdi, L., 2021.** Evaluation in vitro des activités biologiques de *Pistacia lentiscus* L. et de *Pinus pinaster*. Mémoire. *Biochimie*. Université Constantine. Algérie
- Belmokhtar, N., Brahimi, R., Nedjar, R., & Trari, M. (2015).** Preparation and physical properties of the layered niobate $\text{CuO} \cdot 5\text{Nb}_2\text{O}_8$: application to photocatalytic hydrogen evolution. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 39, 433-440.
- Benghanou, M., 2012.** la phytothérapie entre la confiance et méfiance
- Boizot, N., Charpentier, J.P., (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.
- Bolou, G.E.K., Attioua, B., N'guessan, A.C., Coulibaly, A., N'guessan, J.D. et Djaman, A.J., 2011.** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* Planch sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 80, 772 – 790
- Celhay, C., 2013.** Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante: procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi-vis et étude des conditions subcritiques.

- Chagne, D., 2004.** Développement de marqueurs moléculaires chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) et cartographie génétique comparée des conifères *chemistry*, 130(4): 928-936.
- Decaux I. (2002) Phytothérapie:** mode d'emploi. Ed Le Bien Public :p 6-
- Djamaa,A.,Moumni,F.2008.** Contribution à l'étude éco physiologique de deux espèces ligneuses méditerranéennes : Chêne liège (*Quercus suber*) et Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait).mémoire. Biologie et physiologie végétale. Université de JIJEL ..Algerie
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).**Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Journal of Food chemistry*, 97 (4): 654-660.
- Edeas, M. 2007.**Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie* 5, 264-270
- EL-Haoud Hamid , BoufellousMoncef ,AssiaBerrani , HindTazougart , et RachidBengueddour ;2018.**Mentha Spicata, L. SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE: MenthaSpicataL.extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Journal of Food*
- Fiorucci, S. (2006).** *Activités biologiques des composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire.* Nice.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., &Amiot, M. J. (2005).**Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products.*Journal of agricultural and foodchemistry*, 53(5) : 1370-1373.
- Henni,R.,Chekoufi,z.,2020.**Etuded de l'activité biologique (antioxydante, antibactérienne, antifongique) des extraits de l'écorce de *Pinus pinaster*.*memoire.* Biotechnologie microbienne.UniversitéAkli Mohand Oulhadj de Bouira, Algérie.
- Jean-Yves Chabrier.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2010. fffhal-01739123f
- Jouda, M. M., Elbashiti, T., Masad, A. and Albayoumi, M. 2013.**The Antibacterial Effect of Some Medicinal Plant Extract and their Synergistic Effect with Antibiotic. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 5, 23-33
- Journal of Cardiovascular Pharmacology* :** [Octobre 1998 - Volume 32 - Numéro 4 - p 509.515](#)

Kahlouche Riachi Foulla .2013. Evaluation Chimique Et Activite Antibacterienne De Quelques Plantes Medicinales D'algerie. THESE, institut des sciences veterinaires. Universite de constantine 1. Algerie

Kansole M. (2009). Etude Ethnobotanique, phytochimique et atcivités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso : cas de leucas Martinicensis (Jacquin) R. Brown, Hoslundia Opposita Vahl et ORTHOSIPHON PALLIDUS Royle ex Benth. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies.

klervi, L.L., 2005. "Connaissance chimio-taxonomique du genre Turbinaria et étude des composés de défense de différents espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacific sud) ". 210p

Lagnika, L. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Doctoral dissertation, Strasbourg 1.

Leclerc H. Traité de phytothérapie - Thérapeutique par les plantes, Ed. Masson, 1999.

Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., & Tsao, R. (2012). Microwave-assisted

Mahdjoub Araibi, N., Kherafa, I., 2019. Contribution à l'étude de dépérissement de pin maritime (*Pinus pinaster*) : le cas de la forêt communale Beni Derdjine Zebouja. Mémoire. Sciences forestières. Université Hassiba Benbouali de Chlef

Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K (2011). A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. Journal of Ethnopharmacology 133 (2):261-277.

Moreau B., 2003. Maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie,

Packer L, Rimbach G, Virgili F (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. Free Radic Biol Med 27 (5- 6):704-724

Parde ., (19'-IG) : le conifère .Ed. la maison rustique paris VI pp 146-148

Pullaiah T (2006). Encyclopedia of World Medicinal plants, vol 3. Regency publication, Engelwood, Etats-Unis, p 2442.

Rameau, J. C., Mansion, D., & Dumé, G. (2008). Flore forestière française: guide écologique illustré. Région méditerranéenne (Vol. 3). Forêt privée française.

Ramzi, A.A.M., Salah, A.A.A., Sidgi, H., Faisal, M.N.A., Sama, A.Z.A. and Ulrike, L. 2010. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. Evidence Complementary and Alternative Medicine 7(3), 323–330.

Rohdewald P.2002. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. Int J Clin PharmacolTher 40 (4), 158-168.

Sieuge A., (1985): la forêt circumméditerranéenne problèmes, édition Maisonneuve et la rose, paris p68- 367.

Torras, M.A.C., Faura, C.A., Schönlau, F. and Rohdewald, P. 2005. Antimicrobial Activity of Pycnogenol®.Phytotherapy research 19, 647–648

Tourino, S., Selga, A., Nez, A.J., Juliaä, L., Lozano, C., Rraga, D.L., Cascante, M., and Torres, J.L. 2005.Procyanidin Fractions from pine (*Pinuspinaster*) bark: Radical scavenging power in aolution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma Cells. Journal of agricultural and food chemistry 53, 4728-4735

Wichtl M., Anton R. 2003.Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème édition, Ed. TEC & DOC.

Yougken HW (1924.)The drugs of north American Indian II.AM J Pharmacol 97:257-271.

Zeghad, N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinusofficinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. *Mémoire de magister (Ecole doctorale) en Biotechnologie végétale, UnivMentouri Constantine, 7.*

Annexe

Annexe 1

Matériels, appareillages, réactifs chimiques et les milieux de culture utilisés :

matériels	Appareillages	Réactifs chimiques	Milieux de culture
Becher. Erlenmeyer. Entonnoir. Tubes à essai. Bec benzen. Boîtes pétries. Cuve de spectrophotomètre. Micropipettes. Embouts Anse de platine ecouvillon Papier aluminium Papiers filtre. Parafilm	Balance. Agitateur. Autoclave. Spectrophotomètre. Étuve. Plaque chauffante avec agitateur Évaporateur rotatif	Ethanol L'eau physiologique L'eau distillée DPPH Chloroforme Acide sulphurique	Bouillon nutritif Muller hinton

Annexe 2

Composition du milieu Mueller-Hinton :

Extrait de viande de bœuf : 2,0g.

Peptone de caséine : 17,5g.

Amidon de maïs : 1,5g.

Agar : 17,0g.

pH : 7,4.

Annexe 3

Préparation des milieux :

➤ **Muller Hinton :**

- 13g de milieu dans 250 ml d'eau distillée
- Faire bouillir pendant 10 min jusqu'à dissolution complète
- Stériliser à l'autoclave

➤ **Bouillon nutritif :**

- 13g de bouillon nutritif en poudre dans 1l d'eau distillée
- Mélanger et dissoudre complètement
- Stériliser à l'autoclave

Annexe 4 :

Solutions chimiques

Solutions chimiques	Compositions	Quantité
Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois	Folin-Ciocalteu Eau distillé	1ml 10 ml
Carbonate de sodium (7,5%)	Carbonate de sodium Eau distillé	7,5 g 100 ml
trichlorure d'aluminium (AlCl ₃)		

Annexe 5 :

Standards

Standards	Compositions	Quantités
Acide gallique	Acide gallique Ethanol	0,5 mg 5 ml
Quercétine	Quercétine Ethanol	1 mg 5 ml

Résumé

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives.

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique des extraits bruts des parties aériennes de *Pinus pinaster*, appartenant respectivement aux familles des *Pinaceae*. Ceci afin d'évaluer la possibilité de leurs utilisations en tant que source de substances bioactives.

A cet effet, les extraits ont manifesté une excellente activité antioxydante avec les tests DPPH, ainsi que le dosage biochimique a révélé une teneur très élevée en polyphénols et en flavonoïdes dans ces extraits, et une activité antibactérienne excellente contre *Staphylococcus aureus* et *pseudomonas Sp*.

De plus, le criblage phytochimique des glycosides cardiaque à révèle la présence de ces métabolites de façon élevée dans l'écorce de *Pin maritime*

ملخص

لا تزال دراسة الكيمياء النباتية موضوعاً بالغ الأهمية على الرغم من عمرها.

هذا يرجع أساساً إلى الحقيقة أن المملكة النباتية تمثل مصدراً مهماً لمجموعة متنوعة هائلة من الجزيئات النشطة بيولوجياً. هذا التقييم إمكانية استخدام مصادرها للمواد النشطة بيولوجياً. تمت خصيصاً هذا العمل لدراسة الكيمياء النباتية والبيولوجية للمستخلصات الخام لأجزاء الهوائية من الصنوبر البحري. هذا التقييم إمكانية استخدامها كمصدر للمواد النشطة بيولوجياً.

تحقيقاً لهذا الغاية، أظهرت المستخلصات نشاطاً ممتازاً مضاداً للأوكسدة كما كشفت المقاييس البيوكيميائية عن وجود محتوى عالٍ جداً من مادة البوليفينول والفلافونويد في هذه المستخلصات.

ونشاطاً ممتازاً مضاداً للجراثيم. علاوة على ذلك، يكشف الفحص الكيميائي النباتي للجزيئات القلبية عن وجودها بمستويات عالية في لحاء الصنوبر البحري.

Abstrat

The study of plant chemistry is still very topical despite its age. This is mainly due to the fact that the plant kingdom represents an important source of an immense variety of bioactive molecules.

This work is devoted to the phytochemical and biological study of the crude extracts of the aerial parts of *Pinus pinaster*, belonging respectively to the *Pinaceae* families. This is to assess the possibility of their uses as a source of bioactive substances. To this end, the extracts showed excellent antioxidant activity with DPPH tests. As well as the biochemical assay revealed a very high content of polyphenols and flavonoids in these extracts. and excellent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *pseudomonas Sp*.

moreover, Phytochemical screening of cardiac glycosides reveals the presence of these metabolites in a high way in the bark of maritime pine.