

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/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

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

**Domaine :** SNV  
**Filière :** Sciences Biologiques  
**Spécialité :** Analyses Biologiques et Biochimiques

**Présenté par :**

*Mlle GUEMIRI Hadjer*  
*Mlle KAROUCHE Ibtissam*

*Thème*

**Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de  
deux plantes médicinales locales : *Pinus helpensis* Mill. et  
*Pinus penea* L.**

**Soutenu le :** 02 / 07 / 2017

**Devant le jury composé de :**

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M. CHARGUI Achour</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Mme. MEDBOUA Chafiaa</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

**Année Universitaire : 2016/ 2017**

*«La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information ».*

**Albert Einstein**

Mathématicien, Physicien, Scientifique (1879-1955)

*«Beaucoup de chemins mènent à la réussite, mais un seul mène inmanquablement à l'échec ; celui qui consiste à vouloir plaire à tout le monde»*

**Benjamin Franklin**

## 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 »

*Nous tenons à remercier Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour achever ce travail, et tous eux qui ont contribué à la réalisation de ce travail en particulier à:*

*Notre encadreur Monsieur Kadri Nabil maître de conférences à l'université de Bouira, pour avoir accepté de nous encadrer, et qui a proposé le thème de ce mémoire, et pour ses conseils qui ont amélioré la réalisation de ce mémoire.*

*Nous remercions également messieurs les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement :*

*Monsieur Chargui A, maitre assistant à l'université de Bouira, pour accepter de présider ce jury.*

*Madame Medboua C, maitre assistant à l'université de Bouira, pour accepter d'examiner ce travail.*

*Le co-encadreur Mr Bettache Azzedin de l'université de Bordj Bou Arreridj, pour ses conseils et ses encouragements.*

*Les personnels de laboratoire de microbiologie et phytoprotection de l'université de Bordj Bou Arreridj.*

*Tous les enseignants qui ont contribué à nos former durant le cycle d'étude.*

*(Hadjer et Ibtissam)*

## *Dédicaces*

### **A mon père**

Ta sagesse et ton courage ont toujours été sécurisants pour moi. Tu es aussi un travailleur exemplaire et infatigable, avec tes modestes moyens, tu as toujours subvenu à nos besoins, tu as rempli pleinement ton rôle de père. Que Dieu fasse que je continue à bénéficier longtemps encore de tes conseils.

### **A Ma mère**

Depuis mon enfance, tu t'es efforcée de m'inculquer les valeurs morales qui sont les tiennes. J'espère que je suis à la hauteur de tes attentes. Que Dieu te bénisse et te donne longue vie afin que tu bénéficies des fruits de l'arbre que tu as planté et entretenu.

**A mes très chers sœurs : Chaima, Amina, Halima**

**A mes frères : Ahmed, Omar, Zakaria**

**A toute ma grande famille et voisins.**

**A mon binôme Ibtissam**

**A mes amis : Mes amis d'enfance, Mes amis de la fac surtout mon très chère "Yasmin"**

Merci d'avoir toujours partagé avec moi les moments de joie et de peine, Recevez à ce travail en témoignage de tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

**A toute promotion Biochimie fondamentale 2015.**

**A tous mes enseignants du cycle primaire à l'université, pour la connaissance que vous m'avez transmis, à vous tous mes respects.**

**A tous ceux qui me sont chers.**

**Je dédie ce modeste travail.**

*Hadjer*

## *Dédicaces*

Avec l'aide d'ALLAH le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je

dédie :

A toute ma famille : A l'âme de ma chère mère Farida et mon cher père,

Djoudi

Ce travail n'est que le fruit de son soutien, et de son encouragement répété, de leurs prières, de son amour profond. Je souhaite que ce mémoire l'apporte la joie.

Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie

Et je remercie aussi mes grands parents (Taher et Mlika), je leur souhaite la joie et de bonne santé

Et bien sûr A mon frère Nacerdine, et mes sœurs Romaiassa, Anaisse, Naila

Sans oublier mes oncles et tantes, cousine et cousines

A mon binôme Hajder et toute sa famille et surtout sa chère mère.

Enfin, je le dédie à tous mes amis et à tous ceux qui me connaissent et particulièrement ma promo SNV 2017 et à tous mes amis de l'université de Bordj Bou Arreridj

**Ibtissam**

## Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

### Partie I : Etude bibliographique

#### Chapitre I: Plantes médicinales

I.1. Généralités sur les plantes médicinales.....	3
I.2. <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	3
I.2.1. Taxonomie.....	3
I.2.2. Nomenclature .....	4
I.2.3. Description botanique .....	4
I.2.4. Répartition géographique .....	5
I.2.5. Propriétés thérapeutiques .....	7
I.3. <i>Pinus pinea</i> L. (Pin parasol).....	7
I.3.1. Taxonomie.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.3.2. Nomenclature .....	7
I.3.3. Description botanique .....	8
I.3.4. Répartition géographique du pin pignon.....	8
I.3.5. Propriétés thérapeutiques et usage traditionnelle .....	10

#### Chapitre II: Les polyphénols

II. Généralité sur les polyphénols .....	11
II.1. Définition.....	11
II.2. Biosynthèse des composés phénoliques .....	11

II.2.1. La voie de l'acide shikimique.....	11
II.2.2. La voie d'acétate / malonate .....	11
II. 3. Structure et catégories des composés phénoliques .....	12
II.3.1. Les non flavonoïdes .....	12
II.3.1.1. Les acides phénoliques .....	12
II.3.1.2. Les stilbènes.....	12
II.3.2. Les flavonoïdes .....	13
II.3.2.1. Les flavanones .....	13
II.3.2.2. Les isoflavonoïdes .....	13
II.3.2.3. Les tanins .....	13
II.4. Localisation des composés phénoliques dans la plantes .....	15
II.5. Rôles physiologiques des polyphénols dans la plante .....	16
II.6. Propriétés des polyphénols .....	16
II.6.1. Propriétés biologiques.....	16
II.6.1.1. Propriétés anticancéreuse.....	16
II.6.1.2. Propriétés antimicrobiennes.....	16
II.6.1.3. Propriétés anticoagulantes .....	17
II.6.2. Propriétés physico-chimiques .....	18

## **Partie II: Partie expérimentale**

### **Chapitre I: Matériel et méthodes**

I I. Matériel et méthodes .....	19
I.1. Situation géographique de la zone d'étude .....	19
I.2. Matériel .....	20
I.2.1. Matériel végétale .....	20
I.2.1.1. Choix des plantes .....	20
I.2.1.2. Echantillonnage des espèces végétales .....	20

I.2.2. Matériel microbiologique .....	21
I.2.2.1. Souches bactériennes.....	21
I.2.2.2. Souches fongiques.....	22
I.3. Méthodes.....	22
I.3.1. Extraction des polyphénols .....	22
I.3.2. Dosage des phénols totaux .....	24
I.3.3. Dosage des flavonoïdes .....	24
I.4. Etude de l'activité antimicrobienne .....	25
I.4.1. Principe de la méthode (Aromatogramme) .....	25
I.4.2. Préparation des extraits aqueux.....	26
I.4.4. Préparation des disques .....	26
I.5. Activité antibactériennes.....	27
I. 5.1. Préparation de l'inoculum .....	27
I.5.2. Ensemencement.....	27
I.5.2.1. Ensemencement par écouvillonnage .....	27
I.5.2.2. Ensemencement par méthode de stries.....	28
I.5.2.3. Ensemencement par la méthode de Râteau .....	28
I.5.3. Dépôt des disques.....	28
I.5.4. Lecture des aromatogramme .....	29
I.6. Activité antifongique .....	29
I.6.1. Préparation de la suspension de champignons .....	29
I.6.2. Ensemencement.....	29
I.6.3. Lecture des aromatogramme .....	30
I.7. Activité sur des levures .....	30
I.7.1 Préparation de l'inoculum .....	30

## Chapitre II: Résultats et discussion

II.1 Dosage des polyphénols totaux et flavonoïde .....	31
II.2. Activité antimicrobienne .....	32
II.2.1. Effet d'extrait phénolique de <i>Pinus pinea</i> L. et <i>Pinus halepensis</i> Mill. sur la croissance des souches microbiennes (fongiques et bactériennes).....	32
Conclusion .....	44
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

## Liste des tableaux

Tableau I: Principales classes des composés phénolique. ....	14
Tableau II: Propriétés biologiques des quelques poly phénols dans l'organisme. ....	17
Tableau III: Les propriétés physicochimiques de phénol. ....	18
Tableau IV: Description et pouvoir pathogène des souches bactériennes.....	21
Tableau V: Description et pouvoir pathogène des souches fongiques .....	22
Tableau VI: Diamètres d'halos d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis-à-vis d'extraits phénoliques de <i>Pinus pinea</i> L. à (700, 800, 900, 1000 µg/ml).....	33
Tableau VII: Diamètres d'halos d'inhibition en mm sur la croissance des souches microbiennes vis-à-vis d'extraits phénoliques de <i>Pinus pinea</i> L. à (1100, 1300, 1500,1700 µg/ml).....	35
Tableau VIII: Diamètres d'halos d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis -à vis d'extrait phénolique de <i>Pinus halepensis</i> Mill. à (700, 800, 900, 1000 µg/ml).....	38
Tableau IX: Halos d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis-à-vis d'extrait phénolique de <i>Pinus halepensis</i> Mill. à (1100, 1300, 1500, 1700 µg/ml) .....	41

## Listes des figures

Figure 1: L'arbre de pin d'Alep. ....	5
Figure 2: Cône de pin d'Alep.....	5
Figure 3: Les graines de pin d'Alep.....	5
Figure 4: Aire de répartition du pin d'Alep dans le bassin méditerranéen.....	6
Figure 5: La répartition de pin d'Alep en Algérie. ....	6
Figure 6: L'arbre de <i>Pinus pinea</i> L.....	8
Figure 7: Cône et graines de <i>Pinus pinea</i> L.....	8
Figure 8: Aire de répartition géographique du pin pignon dans le monde .....	9
Figure 9: Répartition des plantations de pin pignon par wilaya en Algérie.....	10
Figure 10: Squelette de base des flavonoïdes .....	13
Figure 11: Les grandes familles de polyphénols.....	15
Figure 12: Démarche d'étude expérimentale.....	19
Figure 13: Carte géographique de la zone d'étude. ....	20
Figure 14: Protocole expérimentale de l'extraction de l'extrait brute des plantes. ....	23
Figure 15: Illustration de la méthode de l'aromatogramme sur boîte de pétri.....	26
Figure 16: Teneur en phénols totaux et flavonoïdes de <i>Pinus helpensis</i> Mill et <i>Pinus pinea</i> L. ....	31
Figure 17: Effet des extraits phénoliques des graines de <i>Pinus pinea</i> L. sur la croissance de : A : <i>Candida albicans</i> ; B : Témoins positif (Nystatine), négatif (L'eau distillée).....	34

Figure 18: Effet de l'extrait phénolique des graines de *Pinus pinea* L. sur la croissance de : A : *Aspergillus flavus*; B : Témoin de *Aspergillus flavus* ; C : *Aspergillus ochraceus* ; D : Témoin de *Aspergillus ochraceus* ; E : *Aspergillus niger* ; F : Témoin de *Aspergillus niger* .....37

Figure 19: Effet de l'extrait phénolique des graines de *Pinus helpensis* Mill sur la croissance de : A : *Salmonella*; B : Témoins de *Salmonella* ; C : *S. aureus* ; D : Témoin de *S. aureus* ; E : *Candida albicans*; F : Témoin de *Candida albicans*.....40

Figure 20: Effet de l'extrait phénolique des graines de *Pinus helpensis* Mill sur la croissance de : A : *Salmonella*; B : Témoins de *Salmonella*; C : *S. aureus* ; D : Témoin de *S. aureus* ; E : *E. coli* ;F : Témoin de *E. coli*.....41

## Liste des abréviations

(E-Aq) : Extrait aqueux

AlCl<sub>3</sub>: Chlorure d'aluminium

PDA: (Potato Dextrose Agar)

GN : gélose nutritif

C° : Degrés Celsius

UFC : Unité Formant Colonie

CMI : concentration minimale inhibitrice

pH : Potentiel hydrogène.

DO : Densité Optique

ATB : Antibiotique

ATCC : American Type Culture Collection

h : heure

mn : minute

g : gramme

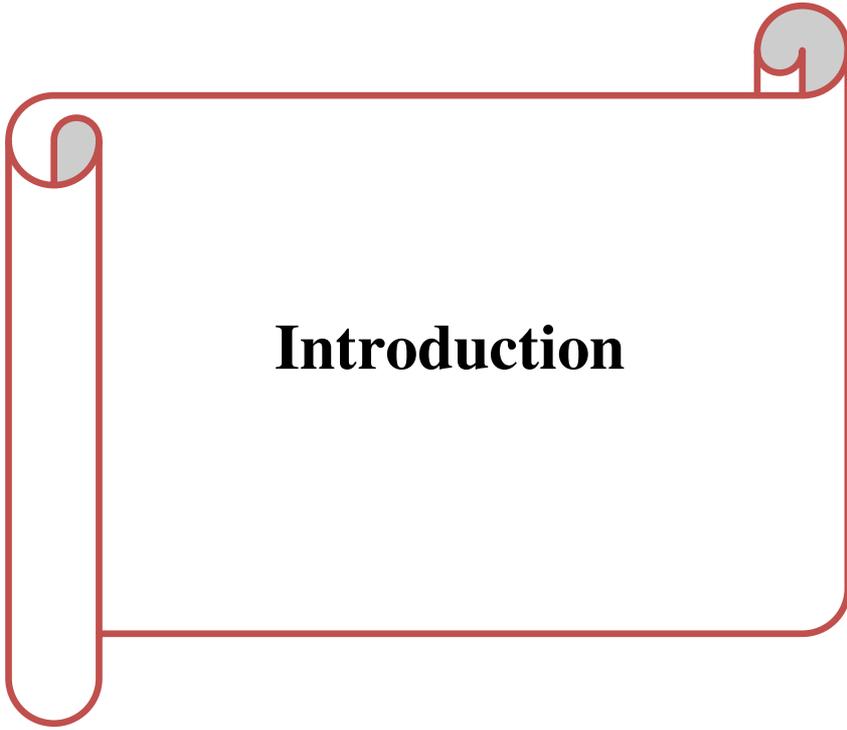
mg : milligramme

L : litre

ml : millilitre

µl : microlitre

Da : Dalton



# **Introduction**

### Introduction

Depuis l'antiquité l'homme utilise son environnement en particulier les plantes comme une source principale pour survivre, au besoin en nutriments et comme remèdes contre plusieurs maladies. De nos jours, les plantes sont encore destinées à la santé humaine malgré les efforts des chimistes qui essayent de synthétiser de nouvelles molécules. (Damintoti et al., 2005).

Actuellement, dans les pays du tiers monde en particulier, la phytothérapie occupe encore une place importante. La flore végétale de ces pays reste assurément riche et prometteuse, tant dans la perspective de découvrir de nouvelles espèces botaniques que de trouver de nouvelles molécules ayant une activité thérapeutique (Messai, 2011).

De plus, les 300 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques, ce qui fait que les plantes sont des réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source des composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes, flavonols, tannin condensé...), l'extraction bruts, naturels de ces composés à partir d'espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peut être une bonne méthodologie pour avoir un réservoir prolifiques de nouveaux médicaments (Laouini, 2014).

L'Algérie est considérée parmi les pays les plus connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne (Messai, 2011). La flore algérienne dispose d'une grande diversité à laquelle s'ajoute une tradition d'utilisation des plantes. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de cette biodiversité végétale en se servant de données ethno-pharmacologiques (Chaouche, 2014).

Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux principes actifs, qui pourraient aider à résoudre le problème croissant de la résistance microbienne (Chaouche, 2014).

Dans ce contexte on propose d'étudier des plantes médicinales, notre choix s'est porté sur la valorisation de deux plantes: *Pinus pinea* L et *Pinus halepensis* Mill récoltées au nord d'Algérie à la région de Béjaia.

L'objectif de notre travail est donc de préparer un extrait aqueux à partir des graines de *Pinus pinea* L. et *Pinus halepensis* Mill. et démontrer la richesse de ces plantes en principes actifs (polyphénols) et d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne et antifongique de notre plantes en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait actif à l'égard des germes microbiens testés.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

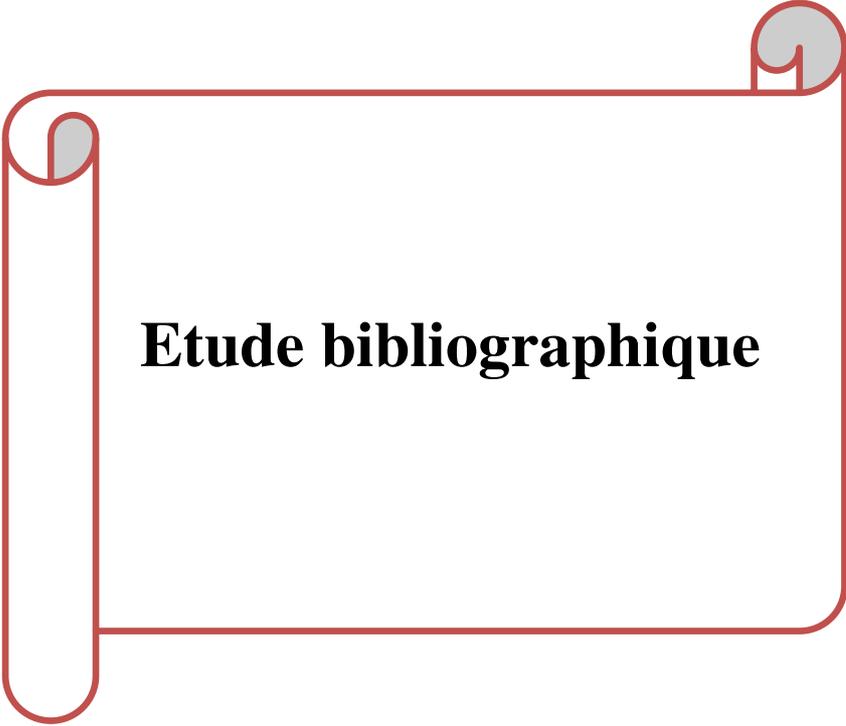
La première, est consacrée à l'étude des plantes médicinales (*Pinus pinea* L. et *Pinus halepensis* Mill.), le nom scientifique et la taxonomie, la description botanique, la répartition géographique, les propriétés thérapeutiques de ces plantes.

Le deuxième chapitre est un aperçu bibliographique sur les polyphénols (biosynthèse, classification et propriétés).

Le troisième chapitre consiste en matériels et méthodes qui ont été utilisés.

Le quatrième chapitre est consacré aux résultats et discussion relatifs à l'activité antibactérienne et antifongique de ces polyphénols.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives à entreprendre à l'avenir.



**Etude bibliographique**

## I.1. Généralités sur les plantes médicinales

Depuis des milliers d'années l'être humain utilise des plantes pour traiter divers maladies, les chercheurs ont considérés qu'il existe environ 400 000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le quart ou le tiers ont été utilisées par les sociétés à des fins médicinales (Benayad, 2013).

La plus part des espèces végétales qui poussent dans le monde possèdent des propriétés thérapeutiques, c'est parce qu'elles renferment des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (Iserin et al., 2007).

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Parmi ces plantes il ya des espèces qui sont cultivées mais dans la plupart des cas ce sont des espèces sauvages (Mohammedi, 2013).

## I.2. *Pinus halepensis* Mill.

### I.2.1. Taxonomie

Le genre *Pinus*, appartenant à la famille des Pinacées (Abiétacées), est divisé en trois sous-genres qui sont *Pinus*, *Ducampopinus* et *Cembrapinus*. Ces sous-genres sont divisés en sections. L'espèce *Pinus halepensis* Mill. fait partie de la section *Halepensoïdes* qui est divisée en trois groupes parmi lesquels le groupe *halepensis*.

La systématique du pin d'Alep établie par Farjon (1996) se résume comme suit par (Guit, 2015):

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphyta

Sous-embranchement : Gymnospermae

Classe : Pinopsida

Ordre : Abietales

Famille : Pinaceae (Abietaceae)

Sous-famille : Pinoïdeae

Genre : *Pinus*

Sous-genre : *Eupinus*

Espèce : *Pinus halepensis* Mill.

### I.2.2. Nomenclature

Noms usuels : Pin d'Alep, pin de Jérusalem, pin blanc (France), Sanaouber halabi dans pays arabes (Hedjal-Chebheb, 2014). Aleppo pine, Jerusalem pine (Angleterre).

Noms vernaculaires : Azoumbei, Tayada en Berbère (Guit, 2015).

### I.2.3. Description botanique

Le Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est une espèce forestière rustique, (Hamrouni et al., 2011) qui survit 250 ans (Rathgeber, 2002).

La hauteur du pin d'Alep est très variable de 6 à 20 mètres. L'écorce des jeunes sujets est lisse, de couleur grise argentée ; celle des arbres adultes est épaisse, de couleur noirâtre à rougeâtre. L'arbre fleurit au printemps et fructifie en été (Hedjal-Chebheb, 2014) , dès l'âge de 10 à 12 ans, mais les graines qu'il produit ne sont aptes à germer que lorsqu'il a atteint l'âge de 18 à 20 ans (Rathgeber, 2002).

Les feuilles sont fines, de 6 à 10 cm de long avec une largeur de 1 mm, molles, d'un vert clair, lisses et aigues, réunies par deux dans une même gaine, en pinceaux à l'extrémité des rameaux (Lazrec, 2015). Le cône est long de 8 à 12 cm, large allant de 3,5 à 4,5 cm, La maturité des cônes estimée par le changement de couleur de vert à rouge violacée, et à maturité deviennent brun rougeâtre à jaunâtre (Fekih, 2015).

Les graines sont de forme ovoïde bombée à trois angles, couleur grise avec une taille de 0.6 cm (Kadri, 2014).



**Figure 1:** L'arbre de pin d'Alep.



**Figure 2 :** Cône de pin d'Alep.



**Figure 3 :** Les graines de pin d'Alep.

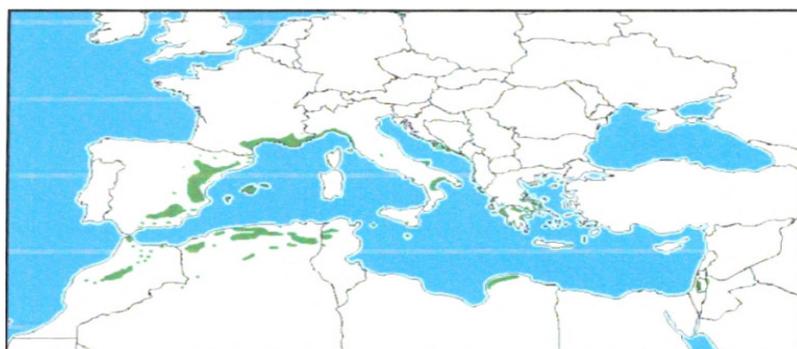
#### **I.2.4. Répartition géographique**

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est un arbre circumméditerranéen que l'on trouve à l'état spontané (Lazrec, 2015), dans les bandes discontinues le long du bassin méditerranéen (Ayari et al., 2011). Ses forêts occupent 3,5 millions d'hectares (Rathgeber, 2002), ils' étend sans continuité du bord oriental de la mer noire et des montagnes de Mésopotamie à la péninsule Ibérique (Alaoui et al., 2011).

En Europe : On le rencontre principalement en Espagne au niveau de la région de Valence et en Italie au niveau de Murcie, et il est assez peu répandu en France (Alaoui et al., 2011).

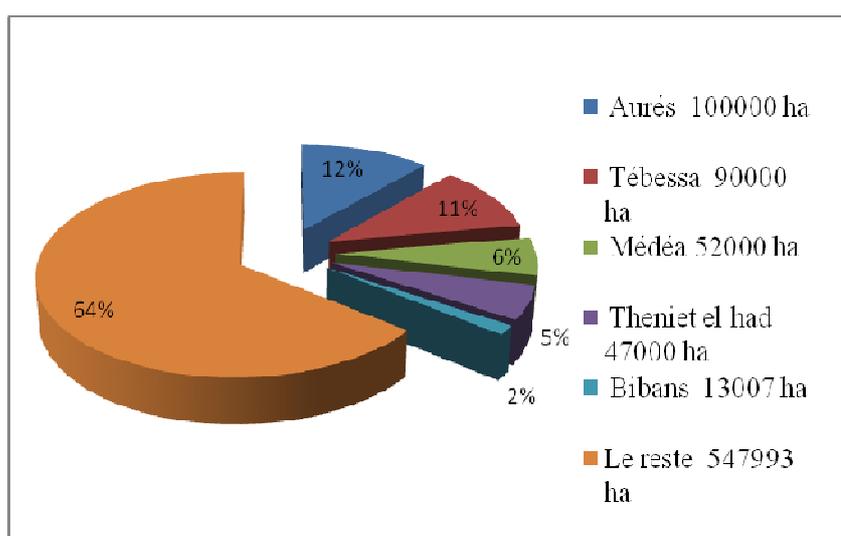
Au Proche-Orient : Le pin d'Alep présent en Turquie vers le Nord-est d'Adana, en Palestine et en Jordanie (Alaoui et al., 2011).

En Afrique du Nord : Le pin d'Alep est plus développé puisqu'il apparaît à peu près partout sur les massifs montagneux ou il couvre une superficie de 1 260 000 hectares (Alaoui et al., 2011). En Algérie, il s'étend à environ 250 m au-dessus du niveau de la mer, et on le trouve aux environs de 2000 m au Maroc et Tunisie (Ayari et al., 2011) ou il couvre 65 000 hectares ha (Alaoui et al., 2011), 300 000 ha (Nasri et al., 2004) respectivement (Figure 4).



**Figure 4** : Aire de répartition du pin d'Alep dans le bassin méditerranéen (Lazrec, 2015).

En Algérie, le pin d'Alep est l'espèce la plus abondante (Derbal et al., 2015), avec une superficie s'étendant à 881.000ha (D erouche, 2015). Le pin d'Alep couvre 35% des surfaces boisées de l'Algérie du Nord (Lazrec, 2015), il est présent dans tous les étages bioclimatiques, depuis le littoral jusqu'à l'Atlas saharien, avec une prédominance dans l'étage semi aride (Khadoumi et al., 2014) (Figure 5).



**Figure 5** : Répartition de pin d'Alep en Algérie.

### I.2.5. Propriétés thérapeutiques

Le pin d'Alep est longtemps utilisé dans la médecine traditionnelle dans de nombreux pays comme source thérapeutique indispensable. Il est connue pour être un analgésique rubéfiant, efficace dans les affections pulmonaires : la grippe, la sinusite, les rhumatismes. Les sirops, les infusions, les tisanes, les jus de *Pinus halepensis* Mill. sont connus par leur effet balsamique pour vaincre les affections catarrhales du système respiratoire (Fekih, 2015). Il est aussi connu pour ses propriétés anti oxydantes (Dhibi et al., 2014), C'est un anti- vieillissement, anti-inflammatoire, anticancéreux, antinéoplastique (Kadri et al., 2015), avec des propriétés antibactériennes (Sadou et al., 2015). Les graines de pin d'Alep, mélangées à du miel, sont utilisées comme aphrodisiaque et spermatogène (Talaa, 2009).

### I.3. *Pinus pinea* L. (Pin parasol)

#### I.3.1. Taxonomie

Le pin pignon ou pin parasol (*Pinus pinea* L.) appartient à la famille des *Pinaceae* (sous famille des *Pinodae*). Debazac (1977) divise le genre *Pinus* en deux sous-genres : *Strobis* et *Pinus*. Le sous-genre *Pinus* est à son tour divisé en 6 sections dont la section *Pinea* comprenant uniquement l'espèce *Pinus pinea* L.

La position taxonomique du pin pignon d'après Gaussen (1982) et Ozenda (1991) est la suivante :

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Gymnospermes

Classe : Coniféropsiidae

Ordre : Coniférales

Famille : Pinaceae

Genre : *Pinus*

Espèce : *Pinea* L (Adili, 2012)

#### I.3.2. Nomenclature

*Pinus pinea* Linné, pinier ou *Pinède*,(Charrier, 2004) en Français, Pin parasol, Pin pignon, nommé par les anglophones, Stone pine, ou Umbrella pine (Fady, 2005).

### I.3.3. Description botanique

Arbre à port typiquement en parasol (Rodrigo et al., 2007), il est sensible aux basses températures, il recherche le soleil et la chaleur, il trouve son optimum sur des terrains sableux et alluviaux (Thabeet et al., 2007).

Le pin pignon peut atteindre 15-25m de haut, les cônes sont de 8 à 15 cm de long sur 7 à 10 cm de large, globuleuses, bruns lustrés, et les graines sont grosses de 1.5 à 2 cm avec une coque dure, les aiguilles elles sont entre 8 à 20 cm de haut, elles sont réunies par 2 ou 3, souples, vrillées, avec bords denticulés (Kadri, 2014).

Il vit entre 200 à 250 ans, mais certains auteurs ont signalé des exemplaires de plus de 400 ans, les bourgeons sont cylindriques, pointus, avec des écailles réfléchies, d'un brun clair, les arbres monoïques, forment des inflorescences cylindriques. L'époque de floraison est comprise entre mai et juin (Adili, 2012), et la fructification au cours du troisième automne suivant la floraison (Charrier, 2004).



**Figure 6 :** L'arbre de *Pinus pinea* L.      **Figure 7 :** Cônes et graines de *Pinus pinea* L.

### I.3.4. Répartition géographique du pin pignon

Le pin pignon (*Pinus pinea* L.) est une espèce répandue sur le pourtour méditerranéen (KHALDI et al., 2009), qui comprend la région méditerranéenne septentrionale, de la péninsule Ibérique à l'Anatolie jusqu'aux côtes méridionales de la mer Noire (Adili, 2012).

La superficie totale couverte par le pin pignon est environ 600 000 ha (75% en Espagne, 9% au Portugal, 8% en Turquie, 7% en Italie, 3% en Tunisie, 0,5% au Maroc avec des pourcentages inférieurs en Grèce, Liban, Algérie et en France), (Adili, 2012).

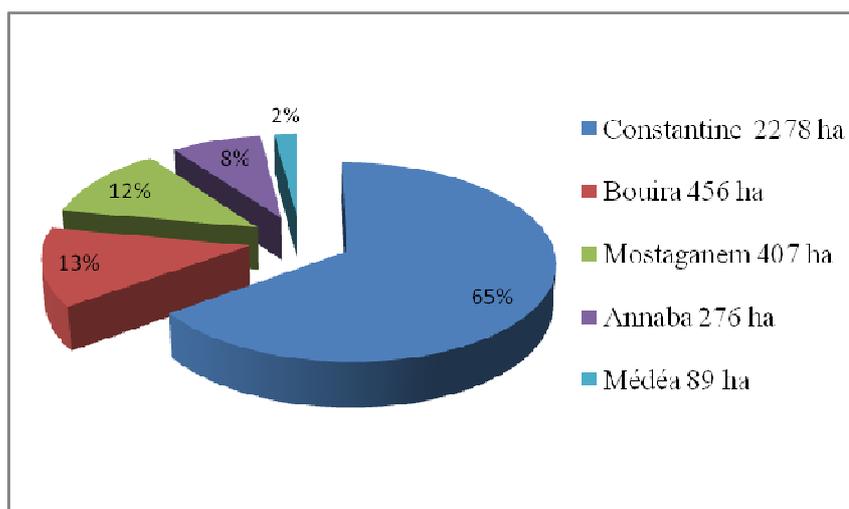
En Afrique du nord, le pin pignon n'existe pas actuellement à l'état spontané. Toutefois, étant donné sa diffusion dans la méditerranée occidentale et la présence en Berbérie de toutes les autres espèces euro-ibériques (Adili, 2012). L'aire de diffusion de *Pinus pinea* L. est illustrée dans la (Figure 8).



**Figure 8** : Aire de répartition géographique du pin pignon dans le monde (Fady, 2005).

En Algérie le *Pinus pinea* L. est essentiellement artificiel ; il a été présenté dans le début du 20<sup>ème</sup> siècle sans savoir les origines des graines (Kadri et al., 2015).

Les plantations de pin pignon ont été réalisées à Meurdja, à Baïnem et à Meslong. Les reboisements récents sont surtout localisés sur les dunes de Bon Achira, dans l'Est et le Nord-Est de Mostaganem, près de Sidi Lakhthar (Figure 9), (Adili, 2012).



**Figure 9** : Répartition des plantations de pin pignon par wilaya en Algérie.

### I.3.5. Propriétés thérapeutiques et usage traditionnelle

Le genre *Pinus* est très connu pour ses propriétés en médecine traditionnelle, il est comme remède pour plusieurs maladies y compris un effet sur le la fatigue. Il est aussi connu pour ses propriétés anti-inflammatoire, anti-vieillessement, antinéoplastiques, antibactériennes, liées à leurs effets sur l'activité de cyclo-oxygénase, anticancéreux, et anti oxydantes (Kadri et al., 2015), il est aussi utilisé pour traiter les infections respiratoires et soulager la tuberculose et les infections urinaires (Charrier, 2004), les angines et les douleurs d'estomac, il est considéré comme possédant une valeur nutritionnelle importante (Kadri et al., 2015).

L'huile de pignon est connu pour être un puissant antiseptique pour les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires, efficace dans les infections pulmonaires: la grippe, la sinusite, les rhumatismes (Fekih, 2015).

## II. Généralité sur les polyphénols

### II.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés dans le règne végétal qui sont regroupés en 8000 composés (Celhay, 2013) . Ils se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs noyaux benzéniques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Zouid, 2011), libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside (Krief, 2003) qui peuvent être méthylés, acylés ou glycosylés (Khater, 2011).

### II.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la formation de la plupart des composés phénoliques chez les végétaux (Hmid, 2013). Ces composés sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate (Boubekri, 2014).

#### II.2.1. La voie de l'acide shikimique

La voie de shikimate fournit un itinéraire alternatif aux composés aromatiques, en particulier les acides aminés aromatiques qui sont : phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Le phosphoénolpyruvate avec l'érythrose-4-phosphate, forment le shikimate (Dewick, 2009).

Les phénylpropanes, sont des métabolites du shikimate susceptibles de se cycliser et d'aboutir à la formation des coumarines, de se dimériser comme dans le cas des lignanes, ou de se polymériser formant alors des lignines.

Les flavonoïdes et les stilbènes résultent d'un allongement de la chaîne latérale (Krief, 2003).

#### II.2.2. La voie d'acétate / malonate

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl CoA (Boubekri, 2014).

### II. 3. Structure et catégories des composés phénoliques

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre d'atomes constitutifs et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base.

Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes (Muanda, 2010), qui présentent tous un point commun : la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (Laouini, 2014).

#### II.3.1. Les non flavonoïdes

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones (Muanda, 2010).

##### II.3.1.1. Les acides phénoliques

Ce sont les dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Koné, 2009).

###### a. Les acides benzoïques

Les acides benzoïques ont une structure de type C6-C1. Le plus important est l'acide gallique (Zouid, 2011).

###### b. Les acides hydroxycinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique, et présentent un squelette carboné de type C6-C3. Les acides hydroxycinnamiques existent généralement dans la plante sous forme de glucosides, ou sous forme d'esters (Khater, 2011), dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique (Laouini, 2014).

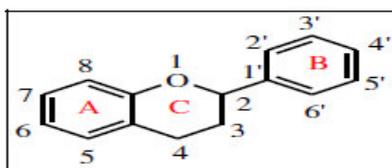
##### II.3.1.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison (C6-C2-C6) (Zouid, 2011).

### II.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, comprenant au moins 6000 molécules. Ce groupe de composés est en effet défini par une structure générale en C15, de type C6-C3-C6 (Figure 10).

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes (flavonols, flavanones, flavanonols, flavan-3-ols, chalcones, et les isoflavonoïdes) (Khater, 2011).



Figurer 10 : Squelette de base des flavonoïdes (Chebil, 2006).

#### II.3.2.1. Les flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et la présence d'un centre chiral en position 2. Elles sont synthétisées à partir des chalcones (Morel, 2011).

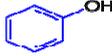
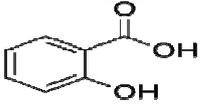
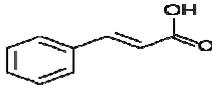
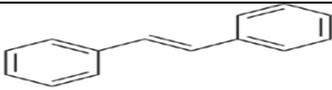
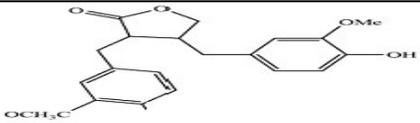
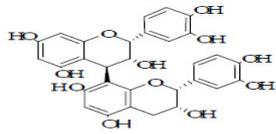
#### II.3.2.2. Les isoflavonoïdes

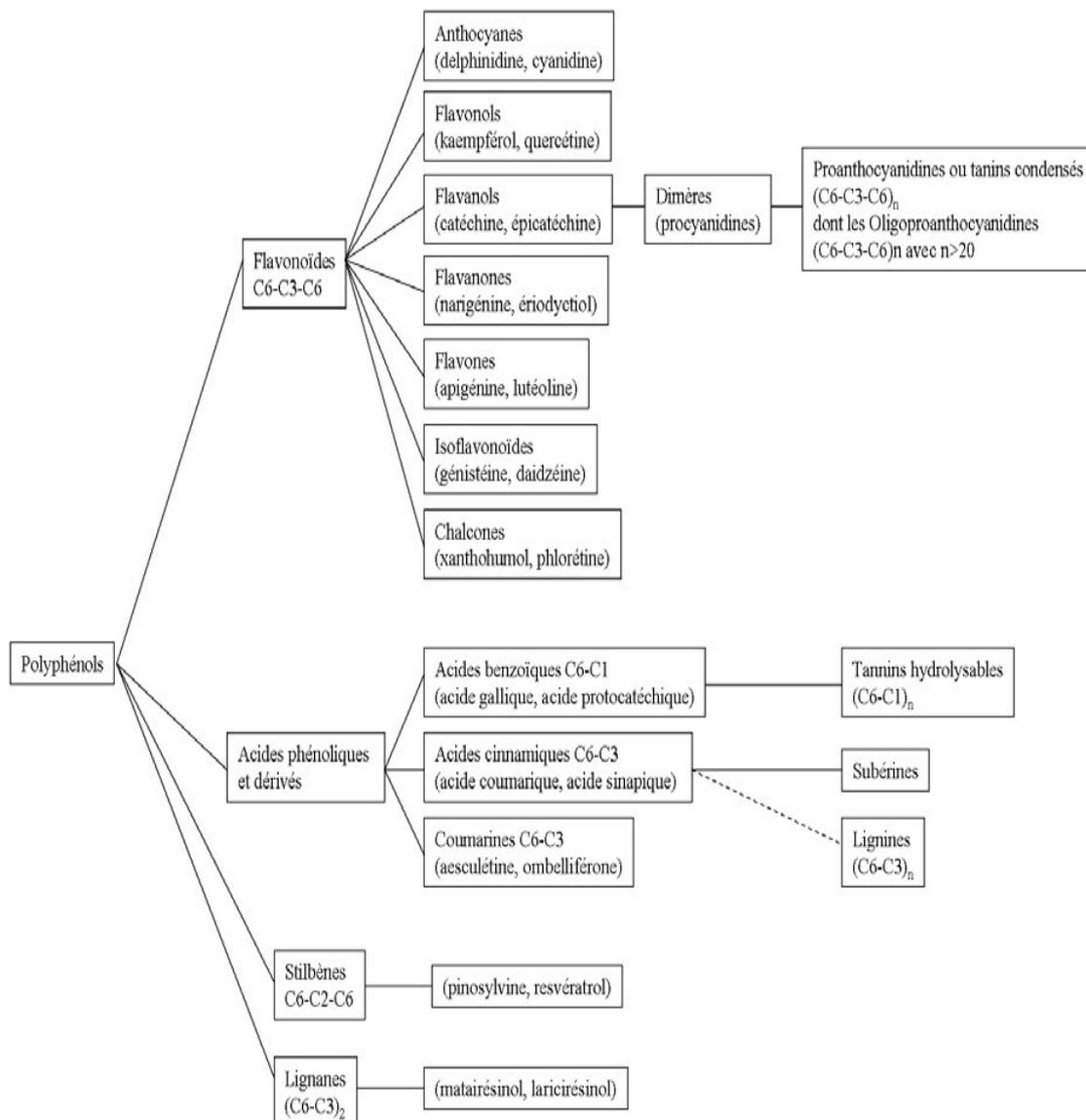
Les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui dans le cas des isoflavonoïdes est attaché en position 3 (en 2 pour les autres flavonoïdes), formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane (Morel, 2011).

#### II.3.2.3. Les tanins

Ils représentent un groupe hétérogène (Nkhili, 2009), à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (Muanda, 2010).

**Tableau I** : Principales classes des composés phénoliques (Halmi, 2015).

Squelette carbonée	classe	Structures de base
C6	Phénol simple	
C6-C1	Acide hydroxybenzoïque	
C6-C3	Acides hydroxyciannimiques comarines	
C6-C2-C6	Stilbénes	
(C6-C3)2	Lignanes	
(C6-C3-C6) n	Tanins condensés	



**Figure 11** : Les grandes familles de polyphénols (Celhay, 2013).

#### II.4. Localisation des composés phénoliques dans la plantes

On les trouve, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit (Nkhili, 2009).

- Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont présents dans l'épiderme.
- Au niveau cellulaire, ils sont répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi.

- Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine (Boubekri, 2014) et des flavonoïdes (Morel, 2011).

## **II.5. Rôles physiologiques des polyphénols dans la plante**

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes pollinisateurs. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes (Madi, 2010). Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux sont synthétisés par la plante pour lutter contre des infections causées par des champignons ou des bactéries (Laouini, 2014).

## **II.6. Propriétés des polyphénols**

### **II.6.1. Propriétés biologiques**

Les polyphénols sont des substances bioactives, qui jouent un rôle important dans la réduction du risque des maladies chroniques et dégénératives (Younes, 2015), et parmi les propriétés biologiques qui ont été attribuées aux polyphénols :

#### **II.6.1.1. Propriétés anticancéreuse**

Les polyphénols ont la capacité d'interrompre ou d'inverser le processus de cancérogenèse, ils peuvent déclencher aussi l'apoptose dans les cellules cancéreuses à travers la modulation d'un certain nombre d'éléments principaux en signal cellulaire (Boubekri, 2014).

#### **II.6.1.2. Propriétés antimicrobiennes**

Il est désormais possible de développer à base de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (Halmi, 2015).

### II.6.1.3. Propriétés anticoagulantes

Les polyphénols inhibent l'agrégation plaquettaire, et réduisent la coagulation du sang qui le rend plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome en prévenant ainsi l'athérosclérose et les risques de thrombose (Muanda, 2010).

Les polyphénol peuvent exercer plusieurs autres effets biologiques comme l'inhibition ou la réduction de différents enzymes (Younes, 2015) et divers activités qui on résulte sont décrites dans le (Tableau II).

**Tableau II:** Propriétés biologiques des quelques poly phénols dans l'organisme.

Polyphénols	Activité	Auteur
Acides phénoliques	Antiulcéreuses	(Koné, 2009)
Lignanes	Antibactériennes Antifongiques Antiallergique	(Richard, 2012)
Les flavonoïdes	Antioxydant, Anti inflammatoires anticacéreuse, Anti-obésité, Antiallergique, Anti-ulcère Anti-prolifération, Antimutagènes anti-atherosclerosis	(Mazué, 2011) (Nkhili, 2009) (Khan, 2010)
coumarines	Anticancérigènes, Analgésiques	(Koné, 2009)

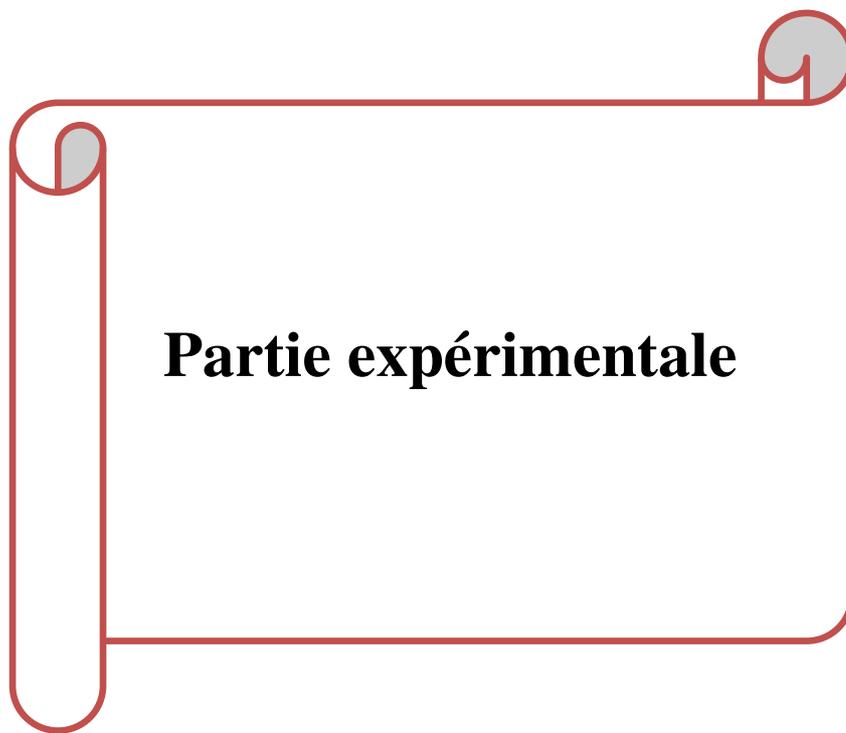
### II.6.2. Propriétés physico-chimiques

Les flavonoïdes polymères et les non-flavonoïdes étant plus polaires sont plus solubles dans l'eau (un solvant fortement polaire, constante diélectrique). (Bonnaillie et al., 2012), La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés (Beddou, 2015).

Le phénol est hygroscopique et a une odeur âcre et douceâtre. Au contact de l'air ou sous l'influence de l'humidité le phénol s'oxyde légèrement pour donner des traces de quinone. Il est miscible dans l'eau, et aussi très soluble dans plusieurs solvants organiques tels que l'acétone, l'éthanol, l'oxyde de d'éthyle, (Balaska, 2015) les autres propriétés sont regroupées dans le (tableau III).

**Tableau III** : Les propriétés physicochimiques de phénol.

Masse molaire (g/mol)	94,11
Densité liquide	1,049
Densité solide	1,071
pKa à 25°C	9,92
Point d'ébullition (°C)	182
Point de fusion (°C)	41
Tension de vapeur à 25°C (mm Hg)	0,350
Inflammabilité	Combustible
Limite d'explosivité	1,3%-8,6% Vol

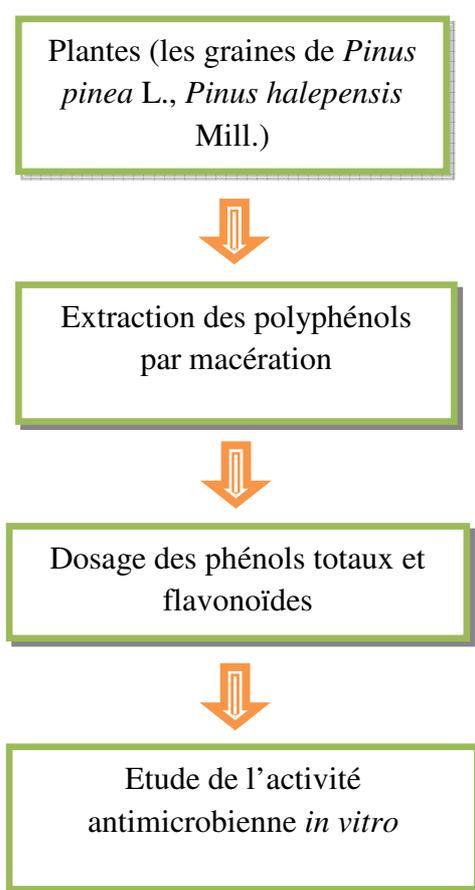


## **Partie expérimentale**

## I. Matériel et méthodes

Cette étude expérimentale a été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et la vie et de l'univers de l'université Mohamed el Bachir el Ibrahimy de Bordj Bou Arreridj, pendant la période allant de 13 Mars à 25 Mai 2017.

Dans le but de rechercher de nouveaux composés antimicrobiens naturels d'intérêt thérapeutique, l'extrait phénolique de *Pinus pinea* L., *Pinus halepensis* Mill., a fait l'objet d'une étude détaillée, la démarche scientifique suivie est schématisée dans la (Figure 12).



**Figure 12 :** Démarche d'étude expérimentale.

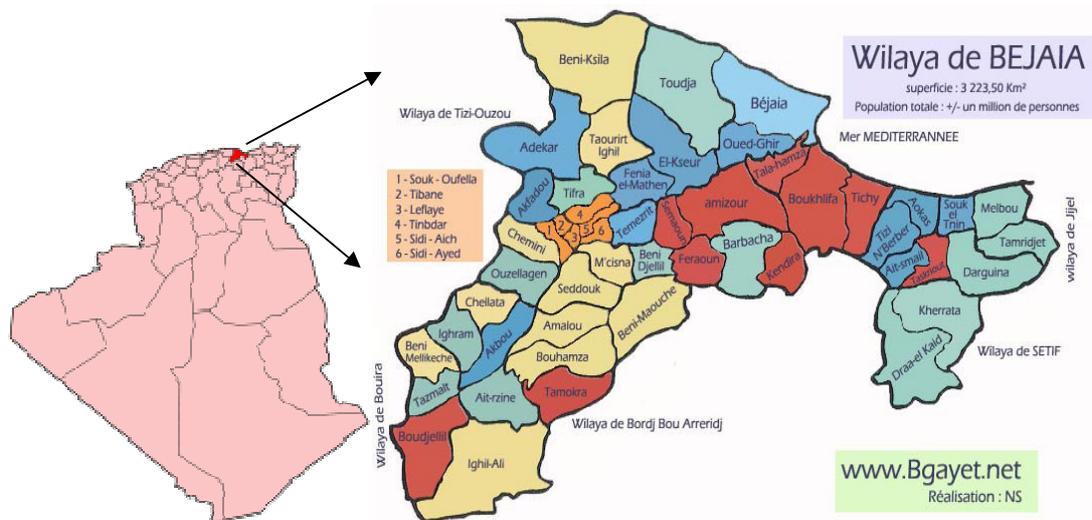
### I.1. Situation géographique de la zone d'étude

C'est une région côtière du Centre Est insérée entre les grands massifs du Djurdjura, des Bibans et des Babors. La wilaya de Bejaia est située au Nord-Est de l'Algérie. Elle est limitée par la mer méditerranée au Nord, avec une façade maritime de plus de 100 Kms, la

wilaya de Jijel à l'Est, les wilayas de Sétif et Bordj-Bou-Argeridj au Sud, et les wilayas de Tizi Ouzou et Bouira à l'Ouest (Benata, 2015).

La région est caractérisée par un étage bioclimatique humide à hiver doux, et des précipitations moyennes annuelles de 782 mm. Les températures élevées s'adressent au mois d'Août, et les plus basses en janvier avec une humidité relative de l'air estimée à 80% (Rabah, 2014).

La superficie forestière totalise 122.500 ha, 38% de la superficie totale de la wilaya (Benata, 2015).



**Figure 13 :** Carte géographique de la zone d'étude.

## I.2. Matériel

### I.2.1. Matériel végétale

#### I.2.1.1. Choix des plantes

Les plantes médicinales étudiées (*Pinus pinea* L, *Pinus halepensis* Mill) ont été choisies parmi les plantes utilisées dans la région Nord d'Algérie. Ce choix est justifié d'une part par l'originalité de ces plantes ou il n'existe presque pas d'études portants sur les activités biologiques des extraits de ces graines, et d'autre part, par leur utilisation dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies qui s'est avéré très efficace.

#### I.2.1.2. Echantillonnage des espèces végétales

Les cônes ont été récoltés dans différentes régions de Bejaia entre les mois de Février et Avril et transportées au laboratoire. Pour récupérer les graines, les cônes ont été introduits dans l'eau chaude qui contribue à dissoudre la résine libérant ainsi les graines.

Les graines ont été nettoyées pour éliminer les impuretés, séchées dans l'étuve à 40 C° pendant 48 heures ensuite broyées séparément et stockées soigneusement dans un endroit sec en vue de leurs utilisations.

### I.2.2. Matériel microbiologique

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques des plantes étudiées, sept souches microbiennes ont été testées dont 3 bactéries, 3 champignons, et une levure, provenant essentiellement du laboratoire de recherche de microbiologie appliqué (LMA) de l'université de Bejaia.

#### I.2.2.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées pour l'étude du pouvoir antibactérien des *Pinus pinea* L. et *Pinus halepensis* Mill. sont trois souches de référence, une parmi elle est à Gram+ (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) et les autres sont à Gram- (*Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enterica ssp. Arizonae* CIP 81-3) (Tableau III).

**Tableau IV:** Description et pouvoir pathogène des souches bactériennes (Chaouche, 2014) ; (Beddou, 2015) ; (Virlogeux-Payant et al., 2012); (Bouzidi, 2016).

Groupe de genre	Espèces	Habitat préférentiel	pouvoir pathogène
Bacille Gram-	<i>E. coli</i>	- Matières fécales	-Infections urinaires
		-Aliments contaminés	-Gastroentérites
		-Eaux usées	
Bacille Gram-	<i>Salmonella</i>	-Aliments	-Fièvres typhoïdes
		-Eaux contaminées	ou paratyphoïdes
Cocci Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-Nez, peau, air	-Infection nosocomiale
			-Infections cutanées
		-Aliment contaminées	

### I.2.2.2. Souches fongiques

Dans l'étude du pouvoir antifongique des *Pinus pinea* L. et *Pinus halepensis* Mill., 4 souches de références ont été testées, trois entre elles ont été des champignons filamenteux appartenant à la même classe (*Aspergillus niger* 939N (ENS-Kouba), *Aspergillus flavus* NRRL (ENS-Kouba), *Aspergillus ochraceus*) et le reste une levure (*Candida albicans* ATCC 1024) (Tableau IV).

**Tableau V** : Description et pouvoir pathogène des souches fongiques (Beddou, 2015) ; (Bourouda, 2010); (Metahni, 2012).

Groupe de genre	Espèces	Habitat préférentiel	Pouvoir pathogène
Moisissures	<i>Aspergillus flavus</i>	-Espèce cosmopolite	-Producteur d'aflatoxines
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	-Sol -Denrées alimentaires	-L'ochratoxine
	<i>Aspergillus niger</i>	-Sol, plantes	-Agent des otomycoses
Levure	<i>Candida albicans</i>	-Tube digestif	- infections viscérales, Candidose superficielles, septicémies

## I.3. Méthodes

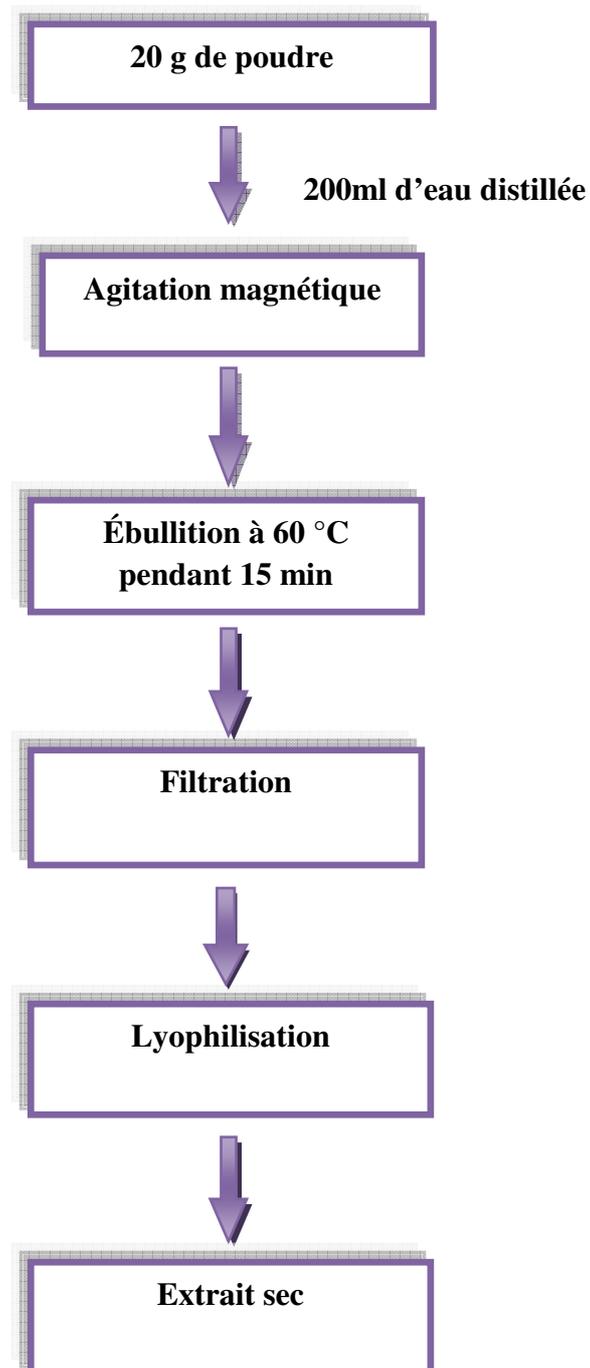
### I.3.1. Extraction des polyphénols

Les polyphénols contenus dans les deux plantes ont été récupérés par macération (Bourouda, 2010). L'extraction a été réalisée selon la méthode décrite par (Ferreira et al., 2006) avec modification.

20 g de poudre des graines de (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L.) ont été délipidés par l'hexane et ensuite macérées dans 200 ml d'eau distillée, cette préparation a été mise sous agitation pendant 24 heures et chauffée à 60° C pendant 15 min. La solution obtenue a été

filtrée sur coton hydrophile et sur papier filtre Whatman N° 3, le filtrat à été ensuite lyophilisé.

La poudre obtenue est le macérât aqueux ou extrait aqueux (E Aq), qui a été caractérisé par une couleur brune foncée à orange et un aspect solide. Les étapes ont été résumées dans la (Figure 14).



**Figure 14 :** Protocole expérimentale de l'extraction de l'extrait brute des plantes.

### I.3.2. Dosage des phénols totaux

La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdène-phosphotungstène du réactif de Folin Cieucalteu par les phénols donnant un complexe de couleur bleue dont la concentration peut être suivie par mesure de l'absorbance (Djeridane et al., 2006).

100 µl d'extrait a été mélangé avec 500 µl de réactif de Folin –Cieucalteu dilué à 1/10 et 1ml d'eau distillé. Après agitation et incubation pendant 1 minute à température ambiante, 1.5ml de carbonate de sodium (20%) à été ajouté et le mélange a été reincubé pendant 2h à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance a été ensuite mesurée à 765 nm.

Les concentrations des phénols totaux ont été déterminées en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec calculé en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec l'acide gallique comme phénol standard.

Le taux de phénols totaux a été déterminé selon la formule suivante :

$$TP(mg / g) = \frac{x(mg) \times D}{P_{essai}}$$

TP: représente la teneur en phénols totaux, X: représente la masse en phénols totaux déterminés à partir de la courbe d'étalonnage, D: représente le facteur de dilution, P essai: représente la masse en gramme de la prise d'essai

### I.3.3. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode du chlorure d'aluminium  $AlCl_3$  suivant le protocole de (Maksimovic et al., 2005) élaboré par Mimica- Dukic (1992).

Les flavonoïdes forment des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) (133 mg de chlorure d'aluminium cristallin et 400 mg de l'acétate de sodium cristallin ont été dissous dans 100 ml de solvant d'extraction), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont l'absorbance maximale est à 430nm.

2 ml d'extrait méthanolique ont été mélangés avec 1ml de la solution de chlorure d'aluminium. Après incubation pendant 10 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 430 nm. Les concentrations des flavonoïdes ont été déterminées en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec calculées en se référant à une courbe

d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec la quercétine comme standard.

Le taux de flavonoïdes a été déterminé selon la formule suivante:

$$TF(mg / g) = \frac{x(mg) \times D}{P_{essai}}$$

TF: représente la teneur en flavonoïdes, X: représente la masse de flavonoïdes déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, D: représente le facteur de dilution, P essai: représente la masse en gramme de la prise d'essai.

#### I.4. Etude de l'activité antimicrobienne

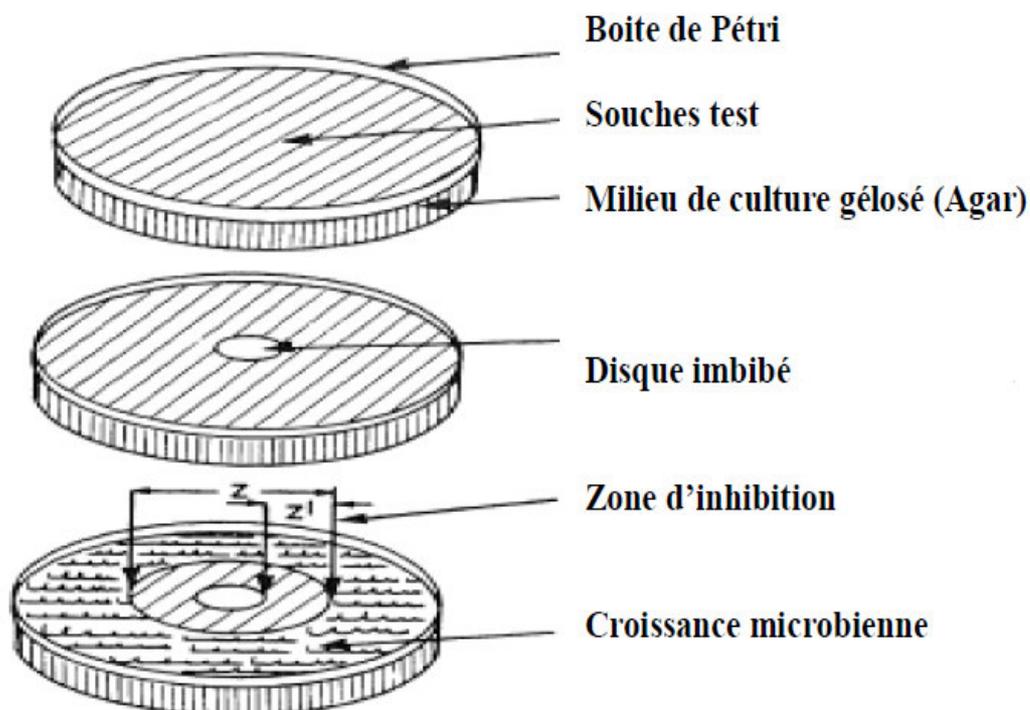
L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux a été testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose (Athamena et al., 2010).

La sensibilité des souches microbiennes, vis-à-vis de : l'Amoxicilline (pour les souches bactériennes), Nystatine (pour les souches fongiques) (30 µg/ disque), ont été utilisées comme contrôle positif et de l'eau distillée stérile (10 µl/ disque) comme contrôle négatif.

C'est une méthode basée sur une technique utilisée en bactériologie médicales appelée antibiogramme, ou méthode de diffusion sur gélose, ou méthode des disques (Kheyar et al., 2014). L'évaluation de l'activité antibactérienne rentre dans le diagnostic médicale, et les testes ont été effectuées selon le protocole de (Chaouche, 2014) ; (Bouzidi, 2016), avec modification.

##### I.4.1. Principe de la méthode (Aromatogramme)

Imprégnant des disques de papier filtre placés au sein d'une gélose coulée en boîtes de Pétri uniformément ensemencée avec une suspension microbienne du germe à tester. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antimicrobien de notre extrait sur les souches étudiées. Ainsi les souches seront qualifiées de sensibles, très sensibles, extrêmement sensibles ou résistantes (Bouzidi, 2016). La figure N° 15 représente le principe de la méthode.



**Figure 15 :** Illustration de la méthode de l'aromatogramme sur boîte de pétri (Fekih, 2015).

#### I.4.2. Préparation des extraits aqueux

0,25 g de la poudre végétale additionnés de 10 ml d'eau distillée, ont été mis en agitation par le vortex jusqu'à la dissolution totale de l'extrait des plantes (*Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L.) pour une concentration de 0,025 g/ml (25000  $\mu$ g/ml), après la préparation des extraits, une gamme de dilution à été établie (Annexe 2).

#### I.4.3. Préparation de milieux de culture

Dans le but de l'évaluation de l'activité antibactérienne des composés phénolique, nous avons utilisé comme milieu de culture la gélose nutritive (GN) (Annexe 03)

#### I.4.4. Préparation des disques

Les disques de papier wattman de 6 mm de diamètre ont été préparés, ensuite enrobés dans du papier aluminium et stérilisés. Puis garder le jusqu'à l'utilisation.

## **I.5. Activité antibactériennes**

### **I. 5.1. Préparation de l'inoculum**

Quelques colonies de souches bactériennes bien isolées et évidentes ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et déchargées dans la pipette dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne a été bien homogénéisée dans le vortex pendant quelques secondes.

L'inoculum doit être standardisé pour obtenir des colonies justes confluentes et sa turbidité ajustée à 0.5 McFarland, a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm ce qui correspond à  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml (D.O = 0.08 à 0.1). L'inoculum peut être ajusté soit en additionnant de la culture bactérienne s'il est faible ou d'eau distillée s'il est trop fort.

La suspension d'inoculum a été diluée à 1 :10 dans l'eau distillée stérile pour avoir une concentration de  $10^7$  germes/ml, (Chaouche, 2014).

### **I.5.2. Ensemencement**

L'ensemencement se fait soit par écouvillonnage ou par inondation, en respectant les mesures de sécurité nécessaires et prendre les précautions en vigueur contre les contaminations, pour éviter la contamination du manipulateur et de la paillasse.

Les milieux de cultures ont été coulés aseptiquement dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 20 ml par boîte. L'épaisseur du milieu doit être de 4 mm car une couche plus fine augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui donne un faux résultat. On laisse refroidir et solidifier sous la Hotte, (Bellahouel, 2012). Quant aux flacons, ils ont été fondus au bain-marie avant l'usage et repartis dans les boîtes de Pétri (GN).

#### **I.5.2.1. Ensemencement par écouvillonnage**

Un écouvillon a été trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement (en le tournant), afin de le décharger au maximum. L'écouvillon a été frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération a été répétée deux fois en tournant la boîte  $60^\circ\text{C}$  à chaque fois.

Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon a été rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de pétri avec la même souche (Bellahouel, 2012).

### **I.5.2.2. Ensemencement par méthode de stries**

0,20 ml de la suspension bactérienne a été ensemencée à l'aide de la boucle de la pipette pasteur, et frotter sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération a été répétée deux fois en tournant la boîte 60° à chaque fois, pour faire une meilleure distribution des bactéries sur la gélose.

Laisser les boîtes de pétri 30 minutes sur la paillassé à température ambiante pour faire sécher l'excès de la suspension (Chaouche, 2014).

### **I.5.2.3. Ensemencement par la méthode de Râteau**

Des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, ont été ensemencées par étalage 1ml de la suspension (bactérienne ou fongique) à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries (Bellahouel, 2012).

### **I.5.3. Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile au bec Bunsen, les disques de papier filtre imprégnés d'extraits à tester à des concentrations de 700 µg/ml, 900 µg/ml, 1000 µg/ml, et 1100 µg/ml, 1300 µg/ml, 1500 µg/ml, 1700 µg/ml respectivement, ont été déposés délicatement à la surface de la gélose inoculée au préalable. Les boîtes de pétri ont été laissées un quart d'heure à température ambiante, pour que le contenu des disques diffuse dans le milieu. Puis fermées avec du ruban adhésif ou paraffine. Des témoins positifs (+) ont été réalisés dans les mêmes conditions, sans extraits aqueux, avec un antibiotique appropriés (l'Amoxiciline pour les souches bactériennes), et (la Nystatine pour les souches fongiques) sous forme de disques prêts à l'emploi pour comparer les résultats et d'autres négatifs (-) contenant des disques imprégnés de l'eau distillée.

Après l'incubation de 24 heures à 37 C°, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition. Plus le

diamètre de la zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante.

#### **I.5.4. Lecture des aromatogramme**

La lecture des aromatogrammes a été faite à l'aide d'une règle millimétrée après 24 h, elle est réalisée au verso de boîte de Pétri, sans l'ouvrir.

L'extrait n'est considéré actif que si le diamètre d'inhibition autour du disque est supérieur à 6 mm.

La sensibilité des souches testées par les extraits a été classée selon les diamètres des halos d'inhibition :

- diamètre < 8mm: non sensible ou résistante (-).
- diamètre compris entre 9 à 14 mm: sensible (+).
- diamètre compris entre 15 à 19 mm: très sensible (++).
- diamètre > 20 mm: extrêmement sensible (+++), (Bouzidi, 2016).

#### **I.6. Activité antifongique**

Selon le même protocole des opérations similaires ont été réalisées à celles effectuées dans l'activité antibactérienne en utilisant le Potato Dextrose Agar (PDA) comme milieu de culture.

##### **I.6.1. Préparation de la suspension de champignons**

Des implants mycéliens sont prélevés à partir des pré-cultures âgées, puis sont mis dans des tubes à essai contenant chacun 10 ml d'eau distillée stérile.

Après agitation au Vortex, l'inoculum a été standardisé pour obtenir des colonies justes confluentes (la suspension de spores à  $10^7$  spores/ml) et la lecture à une longueur d'onde  $\lambda = 530$ . On n'estime qu'une absorbance comprise entre (D.O= 0.09 à 0.17 nm), (Bellahouel, 2012).

##### **I.6.2. Ensemencement**

4 mm de milieu PDA (Annexe 03) ont été coulé dans des boîtes de Pétri sous la Hotte et dans des conditions stériles, une fois la gélose est solidifiée, et à l'aide d'une pipette pasteur des

gouttes (100µl) de différentes suspensions fongiques ont été déposées à partir des suspensions contenant 10<sup>7</sup> spores/ml et l'ensemencement a été fait par l'étalement de cette suspension et distribuées sous forme d'un tapis homogène puis incubées à 25°C pendant 72 heures, (Bellahouel, 2012).

### **I.6.3. Lecture des aromatogramme**

La lecture des antibiogrammes à été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibition au tour des disques après leurs dépôts (le même protocole cité précédemment). Les observations et mesures ont été effectuées avec une règle graduée.

## **I.7. Activité sur des levures**

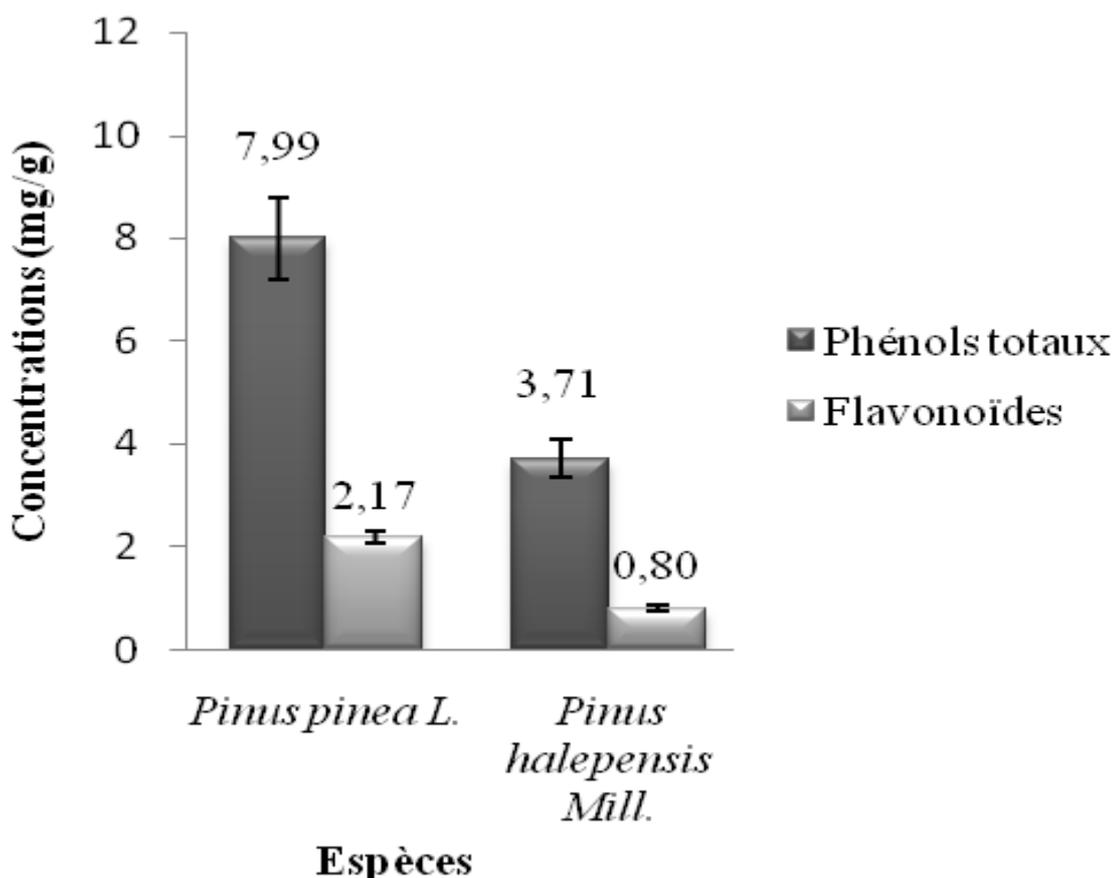
### **I.7.1 Préparation de l'inoculum**

Après 72 h d'incubation à 28°C , 4 à 5 colonies bien isolées sont prélevés avec une anse et émulsionnées dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile, à partir de cette suspension mère, des dilutions ont été préparées dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile.

Puis l'inoculum a été standardisée et ajusté à 0.5 Mc Farland, ce qui correspond à 1-5 × 10<sup>6</sup> UFC/ml pour la levure *C. albicans* (D.O = 0.12 à 0.15 /  $\lambda = 530$  nm) (NCCLS, 2001) puis incubé pendant 48 heures à 30°C.

### II.1 Dosage des polyphénols totaux et flavonoïde

Le taux des phénols totaux et de flavonoïdes dans l'extrait des graines du genre *Pinus* varie d'une espèce à l'autre (Figure 16). Les taux les plus élevés en composés phénoliques totaux ont été détectés dans les graines de *Pinus pinea* L (7,99 mg/g). Par contre, les graines de *Pinus halepensis* Mill. contiennent le taux le plus faible (3,71 mg/g). Le taux de flavonoïdes le plus élevé est détecté aussi dans les graines de *Pinus pinea* L (2,17mg/g), par rapport aux taux de *Pinus halepensis* Mill en flavonoïdes (0,8 mg/g) (Figure 16).



**Figure 16 :** Teneur en phénols totaux et flavonoïdes de *Pinus halepensis* Mill et *Pinus pinea* L.

Par comparaison aux résultats donnés par l'équipe (Nasri et al., 2004) qui a montré que les graines de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L. cultivées en Tunisie représentent 0,26 et 0,23 mg/g de poudre respectivement, on en déduit que pour les mêmes espèces respectives, les extraits de graines cultivées au Nord d'Algérie sont beaucoup plus riches en

composés phénoliques avec des teneurs de 3,71 mg/g et 7.99 mg/g de poudre si on tient compte des conditions climatiques qui se ressemblent entre les deux pays. Les résultats de (Haddada et al., 2007; Zarrouk et al., 2008) confirment l'influence de la variété sur la composition quantitative en composés phénoliques dans l'huile d'olive.

Si on compare, le taux de flavonoïdes mesuré avec ceux des phénols totaux, on en déduit que les graines des deux espèces sont constituées majoritairement d'acides phénoliques. Le rapport taux de flavonoïdes/taux de polyphénols des graines de deux espèces, montre que la fraction de flavonoïde la plus élevée est celle de *P. halepensis* Mill., par rapport à *P. pinea* L. On peut considérer, d'après la moyenne de la consommation des flavonoïdes par l'être humain que les deux graines étudiées sont une bonne source en flavonoïdes.

## **II.2. Activité antimicrobienne**

Dans le but d'estimer le potentiel antimicrobien de nos extraits (*Pinus halepensis* Mill. ; *Pinus pinea* L.). Le choix s'est porté sur plusieurs souches cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

D'après les expériences effectuées par l'aromatogramme qui permet de mesurer la capacité d'un extrait à inhiber la croissance microbienne *in vitro*, nous avons jugé important de compléter notre étude en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

### **II.2.1. Effet d'extrait phénolique de *Pinus pinea* L. et *Pinus halepensis* Mill. sur la croissance des souches microbiennes (fongiques et bactériennes)**

Les résultats des tests antimicrobiens sont regroupés dans les tableaux, et illustrés par les figures.

**Tableau VI:** Diamètres d'halos d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis-à-vis d'extraits phénoliques de *Pinus pinea* L. à (700, 800, 900, 1000 µg/ml).

Les souches	Témoins (mm)			Les concentrations (µg/ml)			
	L'eau	Nystatine	Amoxicilline	Zone d'inhibition (mm)			
				700	800	900	1000
<i>Salmonella enterica ssp. arizonae</i> CIP 81-3	R	—	24 (S)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00(R)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	—	34 (S)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00(R)
<i>E- coli</i> ATCC25922	R	—	33 (S)	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)
<i>Candida albicans</i>	R	29 (S)	—	07 (R)	09 (S)	10 (S)	10 (S)
<i>Aspergillus niger</i> 939N (ENS-Kouba)	R	09 (S)	—	00 (R)	00 (R)	00(R)	00(R)
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL (ENS-Kouba)	R	17 (S)	—	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)
<i>Aspergillus Ochraceus</i> A731C (ENS-Kouba)	R	30 (S)	—	00(R)	00(R)	00(R)	00(R)

R : croissance microbiennes (Résistant) ; S : Pas de croissance microbiennes (Sensible).

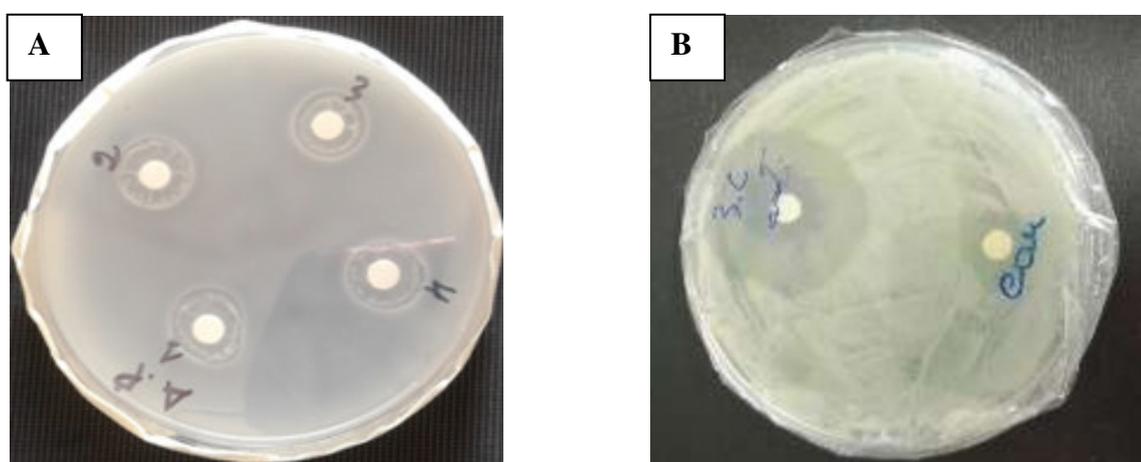
D'après le tableau ci-dessus il ya une grande résistance des moisissures et de bactéries testées vis-à vis d'extrait phénolique de *Pinus pinea* L. allant de 0,7mg/ ml à 1mg/ ml.

Par ailleurs, une très faible activité a été observée vis-à-vis de la souche *Candida albicans* (7, 9, 10, 10 mm) comparativement au témoin (Nystatine 29 mm) et au contrôle négatif (00 mm) (Figure 17), avec une CMI de 800 µg/ ml, en revanche nos résultats sont

significativement supérieur à ceux trouvés par (Mansour, 2014) pour l'extrait de *Lawsonia inermis* L, *Juglans regia* L et *Pistacia lentiscus* L ou les diamètres d'inhibition de 18.67, 16.67 et 17.33 mm respectivement ont été trouvés après leur test sur la croissance de *Candida albicans* à mais à une concentration de 35 mg/ml.

La résistance de nos souches microbiennes peut être attribuée à l'incapacité de l'agent antimicrobien de diffuser uniformément dans l'agar. Le témoin présent des résultats négatifs, ceci implique que l'activité antifongique est probablement due uniquement aux substances renfermées dans l'extrait phénolique de *Pinus pinea* L. le choix de solvant, ainsi que les conditions d'extraction qui affectent les activités biologiques médiées par ces métabolites (Halimi, 2015).

La perte d'activité fongique serait due aux interactions des tanins avec la paroi fongique. Certains tanins sont connus pour se lier aux protéines ; ils pourraient donc probablement induire une modification de perméabilité membranaire et permettre alors l'entrée dans la cellule fongique, d'autres composés qui possèderaient une activité cytotoxique et donc antifongique (Mansour, 2014).



**Figure 17:** Effet des extraits phénoliques des graines de *Pinus pinea* L. sur la croissance de : **A** : *Candida albicans*; **B** : Témoins positif (Nystatine), négatif (L'eau distillée).

**Tableau VII:** Diamètres d'halos d'inhibition en mm sur la croissance des souches microbiennes vis-à-vis d'extraits phénoliques de *Pinus pinea* L. à (1100, 1300, 1500,1700 µg/ml).

Les souches	Témoins (mm)			Les concentrations (µg/ml)			
	L'eau	Nystatine	Amoxicilline	Zone d'inhibition (mm)			
				1100	1300	1500	1700
<i>Salmonella enterica ssp. arizonae</i> CIP 81-3	R	↘	24 (S)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00(R)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	↘	34 (S)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00(R)
<i>E. coli</i> ATCC25922	R	↘	33 (S)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00(R)
<i>Candida albicans</i>	R	29 (S)	↘	09 (S)	09 (S)	10 (S)	11 (S)
<i>Aspergillus niger</i> 939N (ENS-Kouba)	R	9 (S)	↘	04 R	06 (R)	11 (S)	14 (S)
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL (ENS-Kouba)	R	17 (S)	↘	00 (R)	01 (R)	04 (R)	09 (S)
<i>Aspergillus Ochraceus</i> A731C (ENS-Kouba)	R	30 (S)	↘	00 (R)	03 (R)	09 (S)	14 (S)

R : croissance microbiennes (Résistant) ; S : Pas de croissance microbiennes (Sensible).

La variation de la sensibilité microbienne vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Pinus pinea* L. est confirmée par l'existence de différences dans les diamètres d'inhibition aux diverses concentrations d'extrait comme l'indique le tableau ci-dessus.

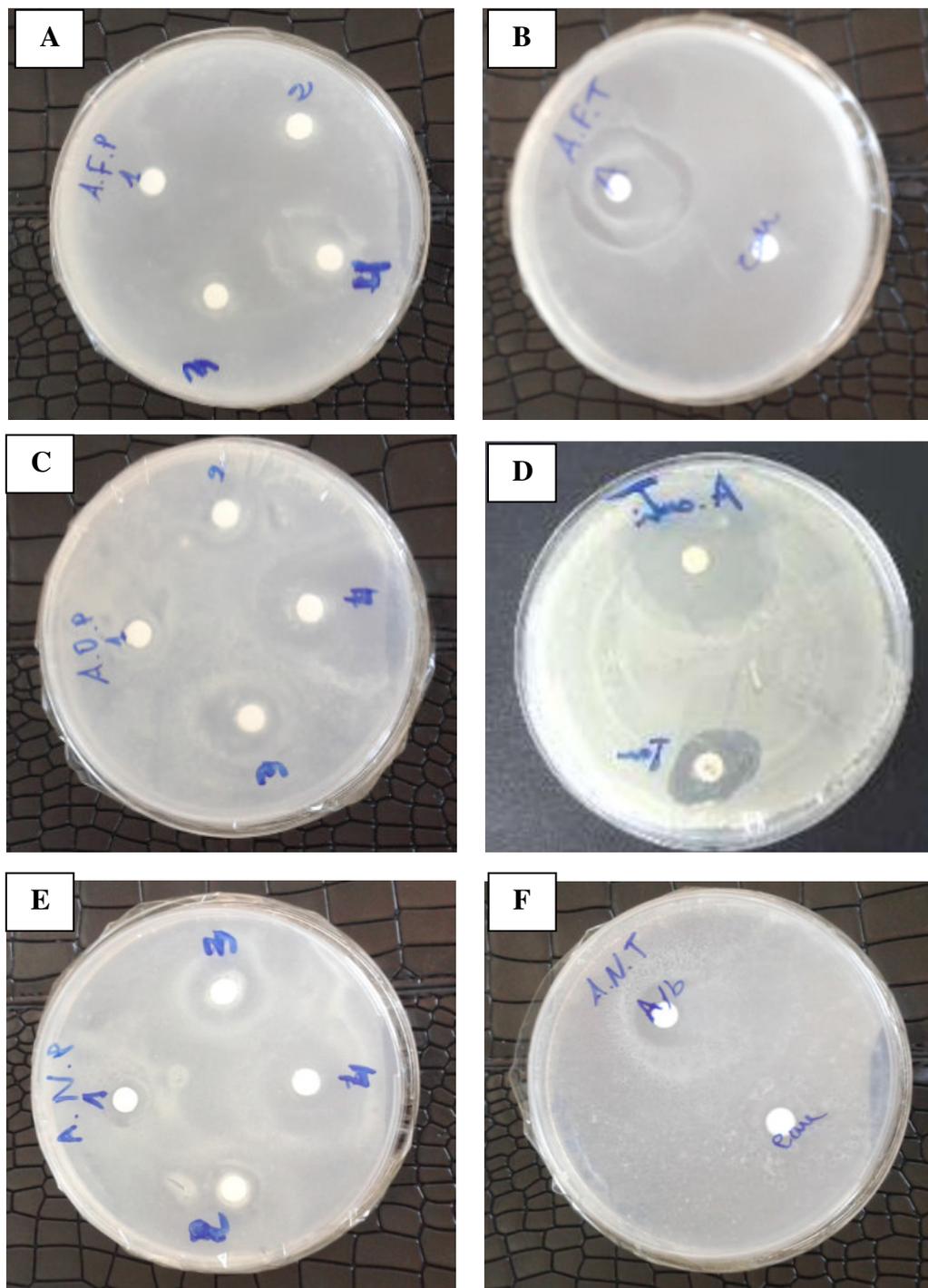
L'effet antifongique est plus au moins important selon la nature de la souche. Nos résultats montrent une inefficacité de *Pinus pinea* L. sur toutes les souches bactériennes testées (*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp), mais l'absence des zones d'inhibitions ne signifie pas nécessairement l'inactivité de l'échantillon testé, parfois certains produits, diffusent plus lentement dans le milieu de culture (Bensizerara et al., 2013).

Chez les espèces fongiques, les diamètres des zones d'inhibition étaient compris entre (9 mm-14 mm) allant de (1100 µg/ml à 1700 µg/ml) par rapport au témoin (Nystatine) et le contrôle négatif (Figure 18).

*Aspergillus flavus* a manifesté une activité antifongique de 09 mm à 1700 µg/ml avec une CMI de 1700 µg/ml, qui s'avère inférieure par rapport aux autres souches fongiques testés. *Aspergillus niger* et *Aspergillus ochraceus* montrent une zone d'inhibition la plus élevée (14 mm) à 1700 µg/ml avec des CMI 1500 µg/ml pour chacun. En comparant avec les résultats trouvés par de (Bellahouel, 2012), un effet inhibiteur plus faible a été souligné sur la croissance de la souche *Candida albicans* (9mm).

Selon (Athamena et al., 2010), aucune inhibition de la croissance n'est observée avec les extraits (*EBr*, *EAcOEt* et *En-BuOH*) des graines de cumin vis-à-vis d'*Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

Les composés phénoliques de nos plantes étudiées ont été trouvés avec une forte activité antifongique, cela se justifie par des mécanismes dont lesquels ces composés réagissent. En effet, ils peuvent interférer avec les biomembranes en provoquant un dysfonctionnement ou une destruction cellulaire. C'est un mécanisme par lequel la croissance mycélienne peut être réduite ou totalement inhibée. Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins sont connus pour avoir la capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne, et l'inhibition des enzymes par adhésion aux protéines (Daglia, 2012; Mohammedi, 2013).



**Figure 18:** Effet de l'extrait phénolique des graines de *Pinus pinea* L. sur la croissance de : **A** : *Aspergillus flavus*; **B** : Témoin de *Aspergillus flavus*; **C** : *Aspergillus ochraceus*; **D** : Témoin de *Aspergillus ochraceus*; **E** : *Aspergillus niger*; **F** : Témoin de *Aspergillus niger*.

**Tableau VIII:** Diamètres d'halos d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis -à vis d'extrait phénolique de *Pinus halepensis* Mill. à (700, 800, 900, 1000 µg/ml).

Les souches	Témoins (mm)			Les concentrations (µg/ml)			
	L'eau	Nystatine	Amoxicilline	Zone d'inhibition (mm)			
				700	800	900	1000
<i>Salmonella enterica ssp. arizonae</i> CIP 81-3	R	↘	24 (S)	04 (R)	05 (R)	06 (R)	09 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	↘	34 (S)	05 (R)	06 (R)	08 (R)	09 (S)
<i>E. coli</i> ATCC25922	R	↘	33 (S)	05 (R)	05 (R)	09 (S)	12 (S)
<i>Candida albicans</i>	R	29 (S)	↘	08 (S)	09 (S)	10 (S)	10 (S)
<i>Aspergillus niger</i> 939N (ENS-Kouba)	R	09 (S)	↘	00 (R)	02 (R)	04 (R)	07 (R)
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL (ENS-Kouba)	R	17 (S)	↘	01 (R)	03 (R)	04 (R)	05 (R)
<i>Aspergillus Ochraceus</i> A731C (ENS-Kouba)	R	30 (S)	↘	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00 (R)

R : croissance microbiennes (Résistant) ; S : Pas de croissance microbiennes (Sensible).

D'après les résultats obtenus, *Pinus halepensis* Mill. semble jouir d'une activité inhibitrice contre les souches bactériennes testées (*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonelle*) à (700, 800, 900, 1000 µg/ml), avec des diamètres de croissance de (9 mm à 12 mm) (Figure 19), par rapport aux contrôles (*Salmonella* (24 mm) ; *S. aureus* (34 mm) ; *E. coli* (33 mm)).

Les niveaux de sensibilité des bactéries vis-à-vis de *Pinus halepensis* Mill. est relativement proche. Avec une faible activité marquée des souches bactériennes telle que, *Salmonella sp* et *S.aureus* avec un diamètre d'inhibition de (8 mm à 9 mm) et une CMI de 1000 µg/ ml pour chacune. Cependant *E. coli* présente une sensibilité plus élevée (12 mm) avec CMI de 900 µg/ ml, par rapport au *S. aureus*.

Des résultats analogues ont été obtenus par Ghanmi *et al.* (2017) sur l'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill. a montré qu'elle présente une bonne activité inhibitrice contre *E. coli* (1/500 V/V) par rapport au *Staphylococcus aureus* (1/250 V/V) (Ghanmi et al., 2007).

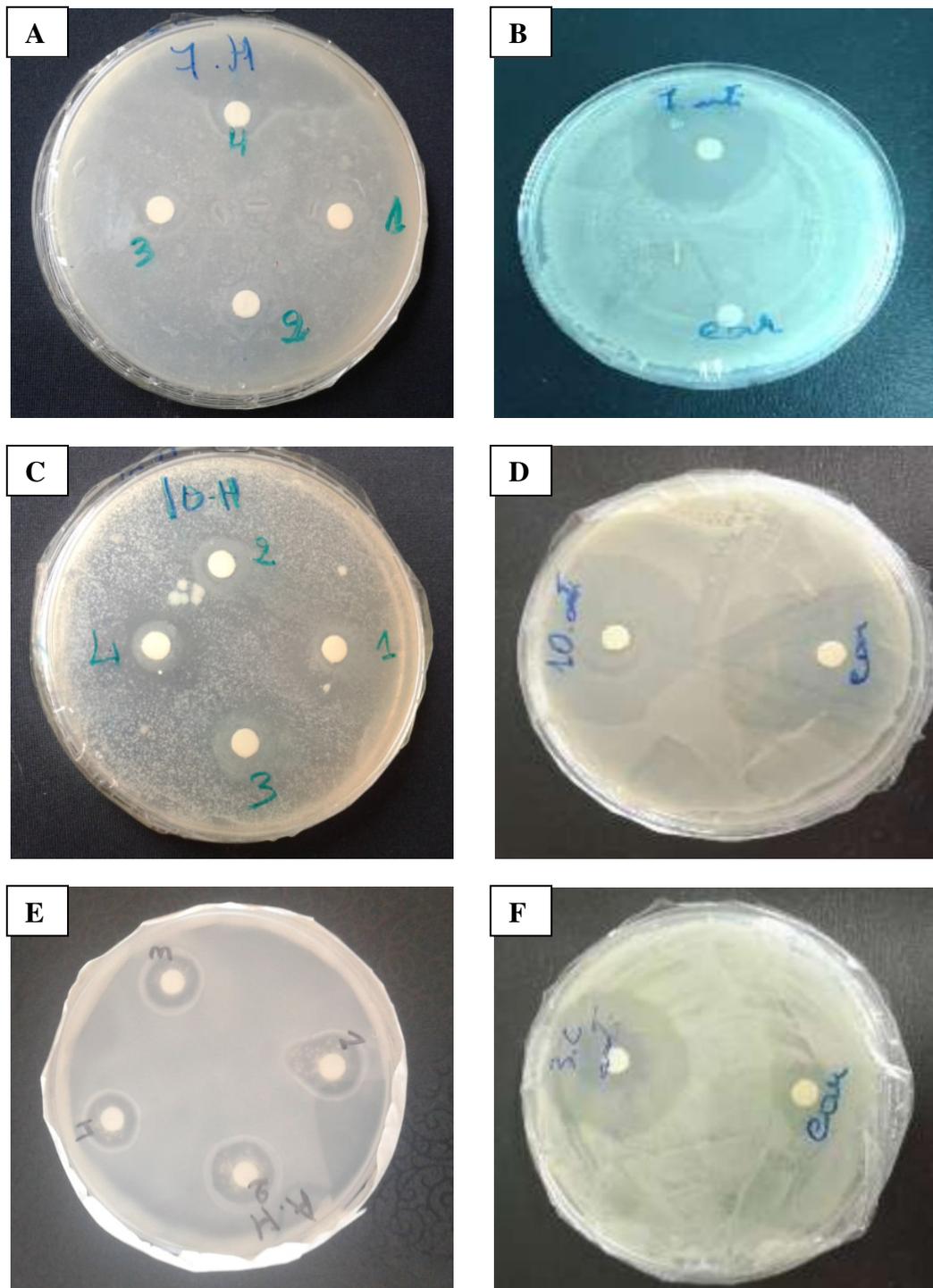
Nos résultats sont comparable à ceux trouvés par (Bellahouel, 2012), pour l'extrait de *Tirmania pinoyi*, qui montre une activité inhibitrice sur *S. aureus* (16 mm) et Salmonelle (11,6 mm), par contre nous avons signalé une sensibilité d' *E. coli* .

Selon (Fekih et al., 2014), l'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill. était inefficace contre *S.aureus*, *E. coli* et *salmonella sp*.

Les champignons filamenteux testés: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, se sont révélées résistants à l'extrait aqueux de *Pinus halpelnsis* Mill. avec des diamètres d'inhibition de (1 mm à 7 mm). Cela peut être expliqué soit par l'absence des molécules fortement antimicrobiennes, soit par la faible capacité des composés antimicrobiens présents dans l'extrait, à diffuser de manière efficace dans l'agar. (Beddou, 2015) par contre *Candida albicans* s'est avéré sensible à l'activité antifongique de *Pinus halepensis* Mill. avec des zones d'inhibitions de (08, 09, 10, 10 mm) à des concentration allant de 700 µg/ ml à 1000 µg/ml.

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir antimicrobiennes n'est pas le même, sachant que les mêmes concentrations d'extraits a été appliquée pour les sept souches microbiennes. On constate que l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce microbienne, la concentration et la nature du produit testé et aussi du milieu de culture utilisé. Le témoin (l'eau distillée) n'a exerce aucune activité inhibitrice, les colonies se développent normalement en présence de l'eau, donc c'est un bon diluant pour notre extrait.

Les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'épigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine (Shan et al., 2007), et lutéoline (Askun et al., 2009), sont des substances antibactériennes importantes. Les flavonoïdes en raison de leur richesse en groupes phénoliques sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques (Djahra et al., 2015).



**Figure 19 :** Effet de l'extrait phénolique des graines de *Pinus halepensis* Mill sur la croissance de : **A :** *Salmonella sp.*; **B :** Témoins de *Salmonella sp.*; **C :** *S. aureus* ; **D :** Témoin de *S. aureus* ; **E :** *Candida albicans*; **F :** Témoin de *Candida albicans*.

**Tableau IX:** Halos d'inhibition en mm de la croissance des souches microbiennes vis -à vis d'extrait phénolique de *Pinus halepensis* Mill. à (1100, 1300, 1500, 1700 µg/ml).

Les souches	Témoins (mm)			Les concentrations (µg/ml)			
	Eau	Nystatine	Amoxicilline	Zone d'inhibition (mm)			
				1100	1300	1500	1700
<i>Salmonella enterica ssp. arizonae</i> CIP 81-3	R	↘	24 (S)	16 (S)	17 (S)	18 (S)	19 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	R	↘	34 (S)	16 (S)	18 (S)	19(S)	20 (S)
<i>E. coli</i> ATCC25922	R	↘	33 (S)	14 (S)	14 (S)	16 (S)	16 (S)
<i>Candida albicans</i>	R	29 (S)	↘	07 (R)	08 (R)	10 (S)	12 (S)
<i>Aspergillus niger</i> 939N (ENS-Kouba)	R	9 (S)	↘	03 (R)	03 (R)	04 (R)	07 (R)
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL (ENS-Kouba)	R	17 (S)	↘	01 (R)	03 (R)	05 (R)	06 (R)
<i>Aspergillus Ochraceus</i> A731C (ENS-Kouba)	R	30 (S)	↘	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00 (R)

R : croissance microbiennes (Résistant) ; S : Pas de croissance microbiennes (Sensible).

L'analyse des données expérimentales montre une activité antibactérienne notable de notre extrait à (1100, 1300, 1500, 1700µg/ml). Comparativement aux témoins (Amoxicilline) et au contrôle, (Figure 25).

Le résultat des testes d'activités antimicrobiennes montre que *Staphylococcus aureus* est très sensible à l'extrait aqueux de *Pinus halepensis* Mill. avec une zone d'inhibition de 20 mm. Par rapport au *E. coli* et *Salmonella sp* avec des zones d'inhibition de 16 mm et 19 mm respectivement à 1700 µg/ml, Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par (Sadou et al., 2015), qui ont observé une sensibilité plus importante chez *S. aureus* que chez *E. coli* vis-à-vis des huiles essentielles de *Pinus halepensis* Mill, en revanche les résultats décrits par (Sihem, 2015) montrent que tous les extraits de *d'Opuntia ficus indica* se sont avérés inactifs contre *E. coli* avec des faible zone d'inhibition observées chez *S. aureus* (entre  $9,03 \pm 0,045$  et  $11,18 \pm 0,104$ mm).à 1mg/ml ; 2,5 mg/ml ; 5 mg/ml.

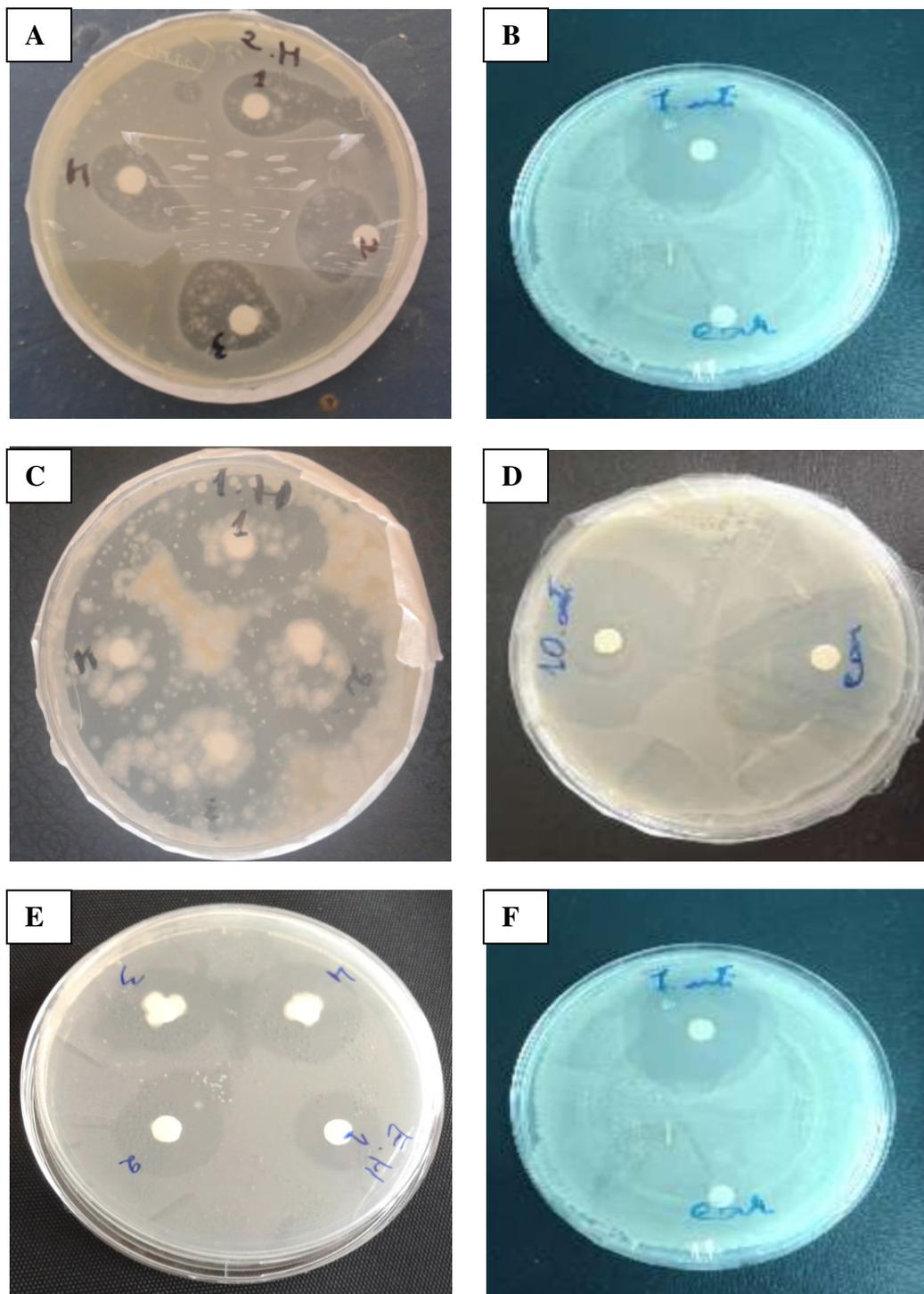
Tandis que nos souches fongiques ont montré une résistance a l'extrait aqueux de *Pinus halepensis* Mill. à l'exception de *Candida albicans* qui s'est avéré sensible à 7 mm, 8 mm, 10 mm, 12 mm à des concentrations allant de 1100 µg/ml à 1700µg/ml (Figure 20).

L'hypersensibilité de la souche *S. aureus* peut être probablement due à la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Balentine et al., 2006).

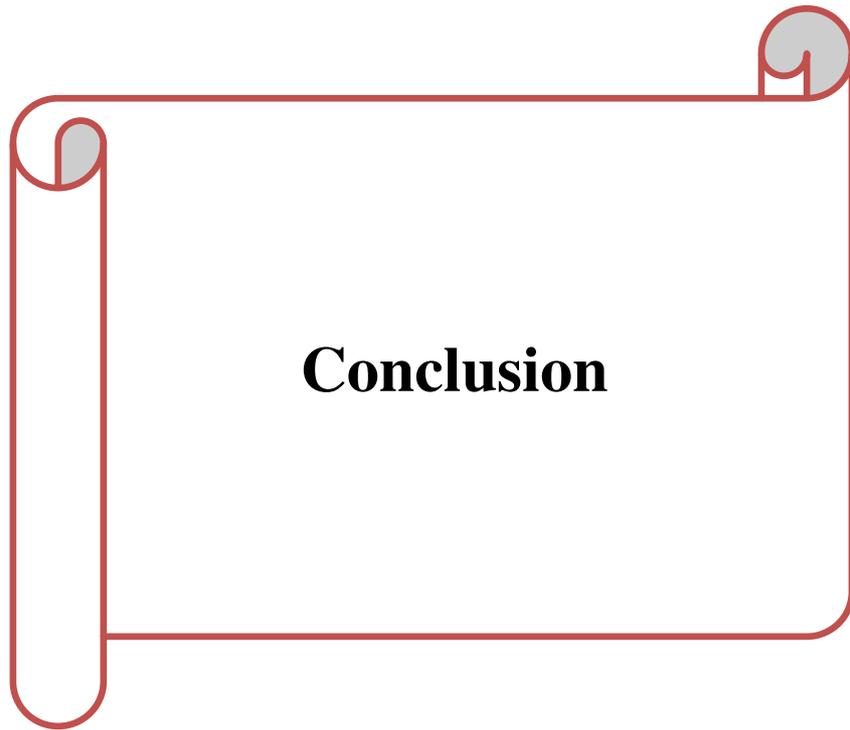
Cette sensibilité plus marquées des Gram positif par rapport aux Gram négatif à été déjà observée dans plusieurs études antérieures ((L. Tchombé N., 2015); (Sadou et al., 2015) ; (Georgantelis et al., 2007)), Ceci peut s'expliquer par la complexité de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif qui possèdent une couche additionnelle par rapport au Gram positif.

La membrane externe, des bactéries Gram négatifs se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules, se qui peut jouer un rôle de barrière vis-à-vis des agents chimiques. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da (Georgantelis et al., 2007).

Les composés phénoliques ont été trouvés actifs vis-à-vis de nos souches microbiennes testées. Nos résultats ont montré que le *Pinus pinea* L. possède des propriétés antifongiques et *Pinus halepensis* Mill. à la des propriétés antibactériennes, ces résultats confirment plusieurs investigations réalisées sur le pouvoir antimicrobienne des composés phénoliques, ce qui justifie l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle.



**Figure 20 :** Effet de l'extrait phénolique des graines de *Pinus halepensis* Mill sur la croissance de : **A :** *Salmonella sp*; **B :** Témoins de *Salmonella sp*; **C :** *S. aureus* ; **D :** Témoin de *S. aureus* ; **E :** *E. coli* ; **F :** Témoin de *E. coli*.



**Conclusion**

### Conclusion

La flore Algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle. Parmi elles, deux plantes ont fait l'objet de notre étude. Il s'agit de *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L.

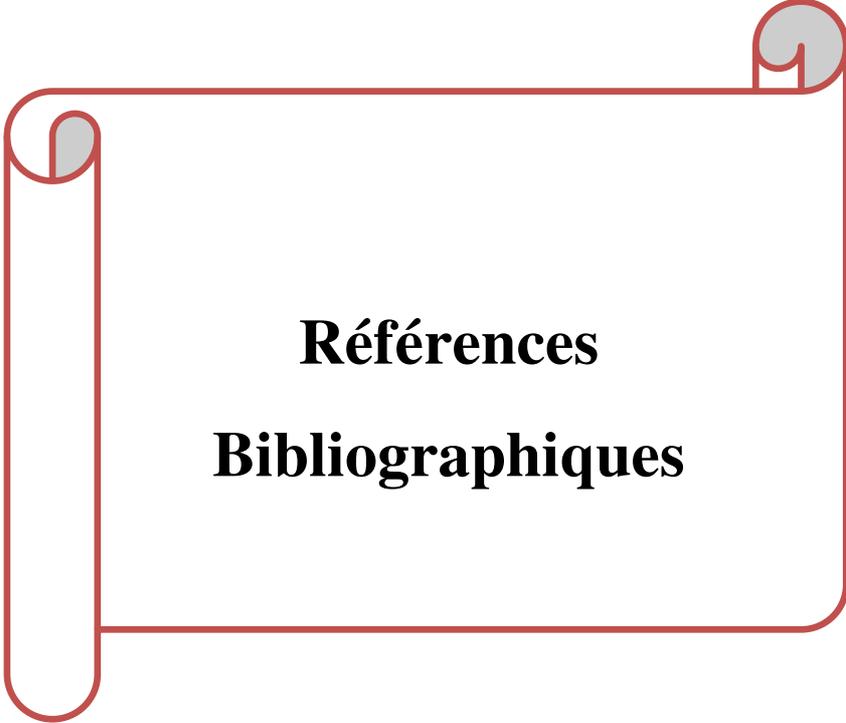
Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence la richesse de *Pinus pinea* L. en polyphénols, et les flavonoïdes par rapport au *Pinus halepensis* Mill. de l'ordre 7,99 mg/g ; 2,17 mg/g respectivement.

L'évaluation qualitative de l'effet antimicrobien montre que l'extrait phénolique de *Pinus halepensis* Mill. est active sur toutes les souches bactériennes testées avec des zones d'inhibition de diamètres variables. Néanmoins, l'effet inhibiteur observé sur *Escherichia coli* serait d'un grand intérêt car cette espèce est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques et extraits de plantes. L'activité de notre extrait sur *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* serait aussi très intéressante.

L'extrait phénolique de *Pinus pinea* L montre une activité antifongique contre toutes les souches fongiques qui ont été testés.

Ces résultats restent préliminaires, il serait intéressant de faire des études complémentaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets.

Ces études doivent être aussi orientées vers la séparation et la purification des composés actifs de ces deux plantes et l'évaluation de leurs effets sur les signalisations impliqués dans le processus antimicrobien.



**Références**  
**Bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Adili, B., 2012. Croissance, fructification et régénération naturelle des peuplements artificiels de Pin pignon (*Pinus pinea* L.) au nord de la Tunisie. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, p. 177.
- Alaoui, A., Laaribya, S., Gmira, N., 2011. Production, croissance et modèles de conduite sylvicoles des principales essences (le pin maritime et le pin d'Alep) de reboisement au Maroc. Kastamonu University, Journal of Forestry Faculty 11, 68-84.
- Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M., 2009. In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. Food chemistry 116, 289-294.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., 2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal 11, 69-81.
- Ayari, A., Moya, D., Rejeb, M., Mansoura, A.B., Albouchi, A., De Las Heras, J., Fezzani, T., Henchi, B., 2011. Geographical variation on cone and seed production of natural *Pinus halepensis* Mill. forests in Tunisia. Journal of Arid Environments 75, 403-410.
- Balaska, A., 2015. Etude de la dégradation du phénol en milieu aqueux en présence des HPA de type DAWSON Génie des procédés. Université Badji Mokhtar-Annaba p. 110.
- Balentine, C., Crandall, P., O'Bryan, C., Duong, D., Pohlman, F., 2006. The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. Meat Science 73, 413-421.
- Beddou, F., 2015. Etude phytochimique et activités biologiques deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss & Dur, Biologie. Université Abou-Bekre-Belkaide Telemcen, p. 143.

Bellahouel, S., 2012. Etude du pouvoir antimicrobien et mycorhizien de deux espèce de terfez: tirmania pinoyi (Maire) Malencon et Terfezia leptoderma tul, Biotechnologie. Université d'Oran, p. 200.

Benata, M., 2015. influence de la culture et de l'environnement sur l'intention entrepreneuriale: cas de l'Algerie. Université Abou-Bekre- Belkaide Telemcen, p. 284.

Benayad, N., 2013. Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines: Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes marocaines et activité anticancéreuse. Université Mohammed V -AGDAL, p. 186.

Bensizerara, D., Menasria, T., Melouka, M., Cheriet, L., Chenchouni, H., 2013. Antimicrobial activity of xerophytic plant (*Cotula cinerea* Delile) extracts against some pathogenic bacteria and fungi. Jordan Journal of Biological Sciences 6, 266-271.

Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., Saykova, I., 2012. Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). 7, 35-45.

Boubekri, C., 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Université Mohamed Khider Biskra.

Bourouda, N., 2010. Place de l'antifongogramme dans la prise en charge des infections fongiques, . Université Mohammed, p. 90.

Bouzidi, N., 2016. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche «*Artemisia herba alba* Asso», Biologie. Université Mustapha Stambouli de Mascara, p. 133.

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.

Chaouche, T.M., 2014. Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales, Biologie. Université Abou-Bakre-Belkaid Telemcen, p. 119.

- Charrier, S., 2004. Le Pin parasol, *Pinus pinea* Linné, 1753, en Vendée. 4, 45-55.
- Chebil, L., 2006. Acylation des flavonoides par les lipases de *Candida antarctica* et *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- Derouche, H., 2015. Télédétection et analyse des dépérissements des forêts Naturelles en zone semi-aride (Djelfa). Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach-Alger p. 198.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology* 23, 174-181.
- Damintoti, K., Mamoudou H, D., Jacques, S., Saydou, Y., Souleymane, S., Alfred S, T., 2005. Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité et la sécurité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. Ouagadougou, 8-11.
- Derbal, W., Zerizer, A., Gérard, J., Guibal, D., 2015. Caractérisation d'aboutages à entures multiples pour trois essences d'Algérie. *Bois et forêts des tropiques*, 59-70.
- Dewick, P.M., 2009. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition, 137-186.
- Dhibi, M., Issaoui, M., Brahmi, F., Mechri, B., Mnari, A., Cheraif, I., Skhiri, F., Gazzah, N., Hammami, M., 2014. Nutritional quality of fresh and heated Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oil: trans-fatty acid isomers profiles and antioxidant properties. *Journal of food science and technology* 51, 1442-1452.
- Djahra, A.B., Bordjiba, O., Benkherara, S., 2015. Activité antibactérienne des flavonoides d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie* 24, 29-37.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* 97, 654.

Fady, B., 2005. Biodiversité des populations de conifères: existe-t-il une spécificité méditerranéenne? Université Paul Cézanne-Aix-Marseille III.

Fekih, N., 2015. propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en Algérie, *Chimie*. Université Abou-Bekr-Belkaid Tlemcen, p. 131.

Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., Djabou, N., Muselli, A., Tabti, B., Costa, J., 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, 97-103.

Ferreira, R.A., Oliveira, A.B., Ribeiro, M.F., Tafuri, W.L., Vitor, R.W., 2006. *Toxoplasma gondii*: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1, 4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Experimental parasitology* 113, 125-129.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S.A., 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat Science* 76, 172-181.

Ghanmi, M., Satrani, B., Chaouch, A., Aafi, A., Abid, A.E., Ismaili, M.R., Farah, A., 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica* 154, 293-300.

Guit, B., 2015. croissance et état sanitaire des peuplements de pin d'alep (*pinus halepensis* Mill.) dans le massif forestier de Senalba (Région de Djelfa). Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El-harache Alger, p. 108.

Haddada, F.M., Manai, H., Oueslati, I., Daoud, D., Sánchez, J., Osorio, E., Zarrouk, M., 2007. Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six Tunisian olive varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 10941.

Halmi, S., 2015. Etude botanique et phytochimique: Approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia Ficus indica*. Université des Freres Mentouri de Constantine, p. 186.

Hamrouni, L., Hanana, M., Ghazi, G., AINI, R., Khouja, M.L., 2011. Essais de multiplication du Pin d'Alep. *Forêt méditerranéenne* 32, 271-276.

Hedjal-Chebheb, M., 2014. Identification des principes actifs des huiles essentielles de quelques résineux et plantes aromatiques de provenance Algérienne et Tunisienne. Etude de leurs activités biologiques à l'égard d'un insecte ravageur des graines stockées, *Callosobruchus maculatus* F.(Coleoptera: Bruchidae). Ph. D. Thesis, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, 107.

Hmid, I., 2013. Contribution a la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*punica granatum* L.): caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Université d'Angers, p. 175.

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J.-P., 2007. Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse.

Kadri, N., 2014. Graines de pinus sp.: caractérisation physico-chimique et activité anticancéreuse., Université Abderrahmane Mira-Bejaia-, p. 170.

Kadri, N., Khettal, B., Aid, Y., Kherfella, S., Sobhi, W., Barragan-Montero, V., 2015. Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food chemistry* 188, 184-192.

Khadoumi, A., Nedjimi, B., Daoudi, B., 2014. Sensibilité à la Chenille Processionnaire (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff.) chez Deux Espèces de Pins (*Pinus halepensis* Mill. et *Pinus brutia* Ten.): Cas du Reboisement de Senelba Chergui (Djelfa). *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"* 4, 20-25.

Khaldi, A., Khouja, M.L., Akrimi, N., 2009. Résultats d'essais de comparaison de provenances du pin pignon (*Pinus pinea* L.) en Tunisie septentrionale.

Khan, M.K., 2010. Polyphénols d'agrumes (flavanones): extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec la sérum albumine. Université d'Avignon.

Khater, F., 2011. Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des composés phénoliques. Montpellier, SupAgro.

Kheyyar, N., Meridja, D., Belhamel, K., 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian J. Nat. Prod* 2, 18-26.

Koné, D., 2009. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes: extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols: étude de leur activité antioxydante. Metz.

Krief, S., 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.

L. Tchombé N., A.L., 2015. Therapeutic Effects of *Ficus Carica* Leaves: A Brief Review. 5, 2225-7217.

Laouini, S.E., 2014. Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). Université Mohamed Khider Biskra p. 115.

Lazrec, F., 2015. Importance de la fonte de semis du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) dans le Nord-Ouest Algérien: Identification morphologique et moléculaire des espèces du genre *Fusarium* et *Globosporangium*, pouvoir pathogène et moyens de lutte, Agro-Foresterie. Université Abou Bekre Belkaid-Tlemcen, p. 187.

Madi, A., 2010. caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (thym et sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Université Mentouri Constantine.

Maksimovic, Z., Malencic, D., Kovacevic, N., 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource technology* 96, 873.

Mansour, D.H., 2014. evaluation chimique et activite antidermatophyte de quelques plantes medicinales d'algerie. Université Constantine 1.

Mazué, F., 2011. Effets des polyphénols de vin rouge sur la prolifération cellulaire et sur le métabolisme du resvératrol. Dijon.

Messai, L., 2011. Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'est Algérien (*Artemisia herba-alba*). Université Mentouri Constantine

Metahni, A., 2012. Déposition et réenvol de spores fongiques: contribution à la compréhension du risque nosocomial aérotransmis. Ecole normale supérieure de lyon-ENS LYON, p. 175.

Mohammedi, Z., 2013. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes Médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie, Université de Tlemecen, p. 160.

Morel, S., 2011. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth.(Fabaceae). Université d'Angers.

Muanda, F.N., 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, 55-86.

Nasri, N., Khaldi, A., Triki, S., 2004. Variabilité morphologique des cônes et graines de pin d'Alep et pin pignon en Tunisie. *Revue forestière française* 56, 22.

Nkhili, E.-z., 2009. Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat, Montpellier 2009.

Rabah, B., 2014. Etude des potentialités biologiques, cartographie et aménagement de la chaîne des Babors dans la démarche du développement durable Université Ferhat Abbas Sétif-1, p. 117.

Rathgeber, C., 2002. Impact des changements climatiques et de l'augmentation du taux de CO<sub>2</sub> atmosphérique sur la productivité des écosystèmes forestiers: exemple du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Provence calcaire (France). Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'AIX-Marseille (AIX-MARSEILLE III), p. 312.

Richard, A., 2012. Synthèse bibliographique de la phytothérapie et de l'aromathérapie appliquées à la dermatologie.

Rodrigo, A., Quintana, V., Retana, J., 2007. Fire reduces *Pinus pinea* distribution in the northeastern Iberian Peninsula. *Ecoscience* 14, 23-30.

Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., Hadeff, Y., 2015. Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie* 30, 33-39.

Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J.D., Corke, H., 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology* 117, 112-119.

Talaa, S., 2009. Etude ethnopharmacologique des plantes aphrodisiaques Enquête effectuée dans la région Casablanca-rabat durant la période entre 01/09/2008 et 30/03/2009. Mohammed V, p. 145.

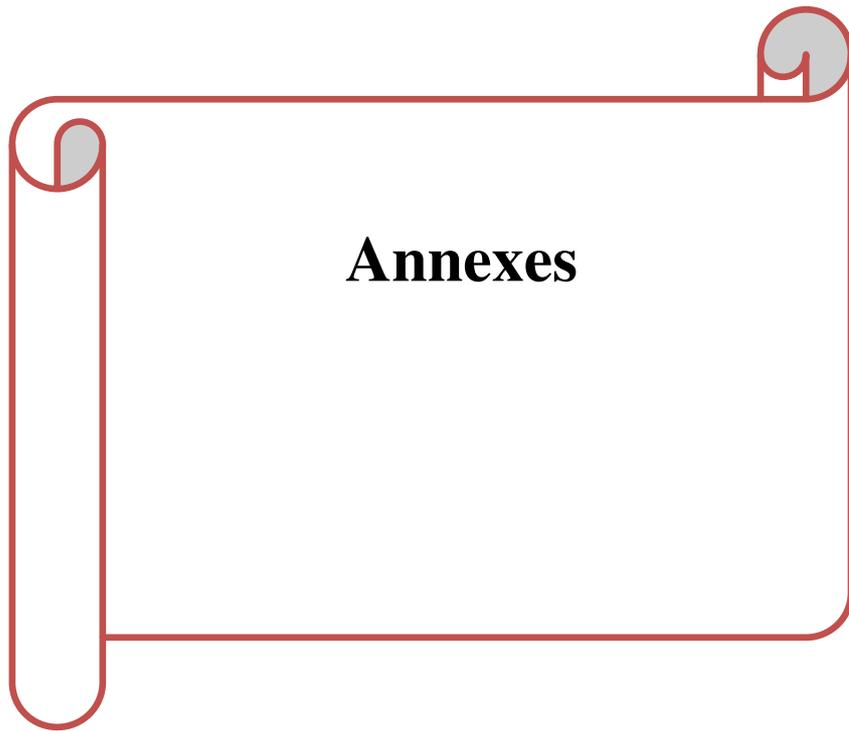
Thabeet, A., Denelle, N., El korchani, A., Thomas, A., Gadbin-henry, C., 2007. Etude dendroclimatologique de quatre populations de pin pignon en Tunisie. Forêt méditerranéenne 28, 219-228.

Virlogeux-Payant, I., Lalmanach, A.-C., Beaumont, C., Hirt, H., Velge, P., 2012. Salmonella, de la plante au tube digestif: des recherches pour élaborer des stratégies de lutte. 24, 35-48.

Younes, K., 2015. Contribution a letude chimique et biologique de deux plantes medicinales de la région ouest dalgerie. Université Abou-Bekre Belkaid Tlemcen.

Zarrouk, W., Haddada, F.M., Baccouri, B., Oueslati, I., Taamalli, W., Fernandez, X., Lizzani Cuvelier, L., Daoud, D., Zarrouk, M., 2008. Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia. European journal of lipid science and technology 110, 81.

Zouid, I., 2011. Etude de l'évolution et de l'extractibilité des composés phénoliques du raisin en milieu hydroalcoolique pendant la maturation: lien avec les propriétés mécaniques de la baie. Angers, p. 285.



## **Annexes**

### Annexe 1 :

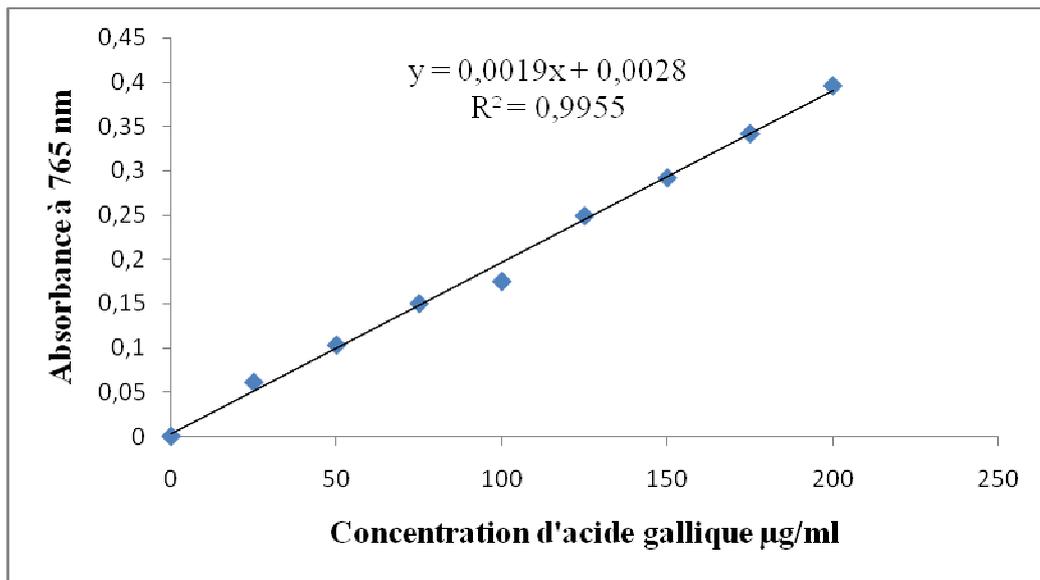


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des phénols totaux

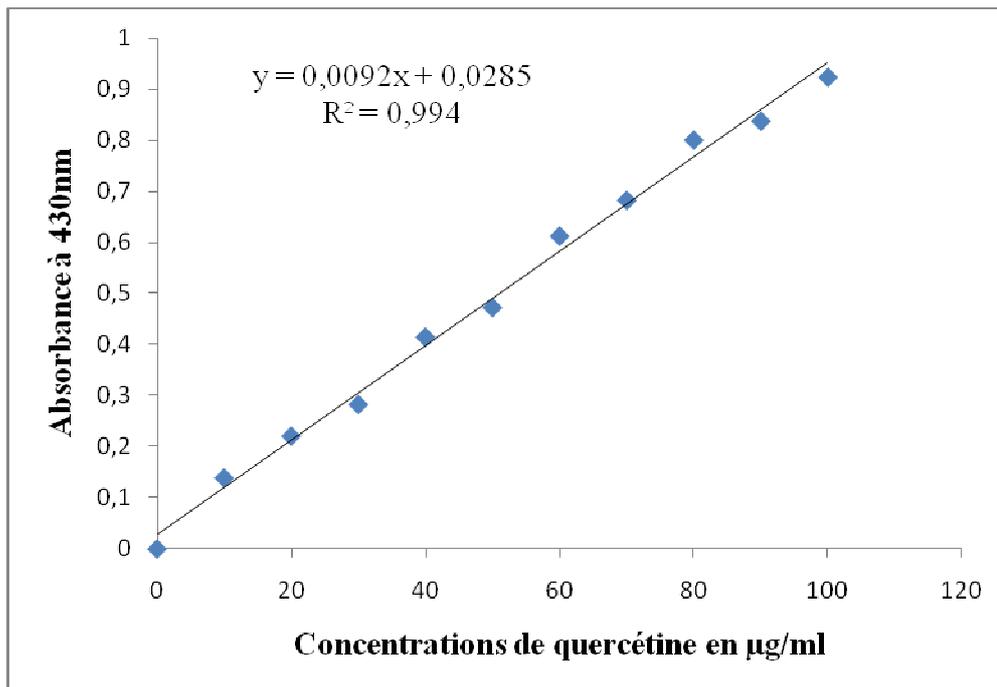


Figure 2: Courbe d'étalonnage des flavonoids

## Annexe 2 :

### Préparation des différentes concentrations d'extraits aqueux

Préparer quatre concentrations d'extraits aqueux (EAq) de façon croissant, comme suit :

1<sup>ère</sup> concentration: 100µg/ml dans 2 ml

$$C1.V1 = C2.V2$$

$$25000\mu\text{g/ml}. V1 = 100\mu\text{g/ml}. 2\text{ml}$$

$$V1 = 200\mu\text{g/ml} / 25000\mu\text{g/ml} = 0,008\text{ml} = 8\mu\text{l}.$$

Donc pour avoir la concentration de 100µg /ml dans 2ml à partir de la solution de 25000µg/ml, on prend 8µl de cette dernière à laquelle on ajoute 1992µl d'eau distillée.

**Tableau :** les différentes dilutions de la solution mère.

Concentration C2 (µg/ml)	100	200	300	400	700	800	900	1000	1100	1300	1500	1700
Volume V1 (µl)	8	16	24	32	56	64	72	80	88	104	120	136

### **Annexe 3 :**

#### **Les milieux de culture :**

##### **Gélose nutritif (GN)**

Dissoudre 20 g de gélose nutritif dans 1l d'eau distillée, faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète. La solution obtenue est ensuite stérilisée à 121°C dans l'autoclave pendant 15 minutes, avec un PH  $7 \pm 0,2$ .

##### **Mueller Hinton (MH)**

Le milieu Mueller Hinton a été utilisé sous forme déshydraté.

Ces milieux prêts à l'emploi ont été conservés à 4°C dans des flacons bien fermés.

##### **Potato Dextrose Agar (PDA)**

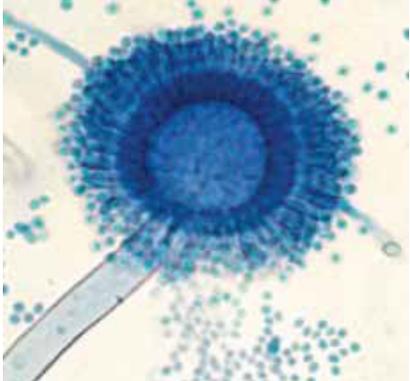
Les pommes de terre ont été pelées, lavées et coupées en tranches minces à raison de 200 g et ensuite cuites dans 400 ml d'eau distillée, pendant 15 à 20 mn et homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique. 10 g de glucose et 8 g d'Agar, ont été ajoutés au filtrat puis le volume a été porté à un litre par l'eau distillée. L'ensemble a été porté à ébullition pour permettre la dissolution des cristaux après autoclave (pendant 15 minutes à 121°C) avec un pH de  $5 \pm 0,2$ .

Tout le matériel et milieux de culture à être utilisés ont été stérilisés dans l'autoclave à 120°C pendant 15 min pour éliminer tout risque de contamination.

#### Annexe 4 :

Les souches	Caractères cultureux	Morphologie microscopique	Photos sous le microscope
<p>A. ochraceus</p>	<p>Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques à une température de 25 à 30°C.</p> <p>Les colonies d'A. ochraceus sont poudreuses ou granuleuses, blanches au début, puis jaunes ou ocre-jaunes à chamois. Le revers de colonies est incolore au jaune pâle</p>	<p>Les têtes conidiennes sont bisériées, d'abord globuleuses puis se séparent en 2 ou 3 colonnes divergentes, bien individualisées, de couleur jaune, ocre-jaune</p> <p>vésicules sont globuleuses, hyalines, 30-50 µm en diamètre. Les phialides (7-10 x 2-3,5 µm) sont portées par des métules, de dimensions variables. Les conidies sont sub-globuleuses à globuleuses. Elles mesurent 2,5-3 (3,5) µm de diamètre, sont finement échinulées ou lisses.</p> <p>Les sclérotés, souvent présents, de couleur lavande à pourpre, sont globuleux, ovales ou cylindriques, et atteignent 1mm</p>	

<p><i>Aspergillus. niger</i></p>	<p>Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais <i>A. niger</i> peut se développer jusqu'à 42°C.</p> <p>Les colonies d'<i>A. niger</i> sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek, <i>A. niger</i> forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore</p>	<p>Les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides (7-10 x 3-3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5 µm de diamètre, sont brunes, échinulées à très verruqueuses.</p> <p>Les sclérotes parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé</p>	 
----------------------------------	---	---	---

<p><i>Aspergillus. flavus</i></p>	<p>Le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C.</p> <p>Sur le milieu de culture <i>A. flavus</i> forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés</p>	<p>Les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. Les vésicules sont sub-globuleuses, et mesurent 45 µm de diamètre. Les phialides sont insérées directement sur la vésicule (unisériées) ou portées par des métules. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de 3-6 µm de diamètre, de couleur verte pâle, verruqueuses. Les sclérotés, fréquents dans les isolats récents, sont globuleux à sub-globuleux, d'abord blanc puis virant au brun-rouge foncé et au noir</p>	 
-----------------------------------	--	---	---

Souches	Systématique	Description et pathogénicité
<p style="text-align: center;"><i>Candida albicans</i></p>	<p>Domain :Fungi  Emb :Askomycota  Class :Saccharomycetales  Famille:Saccharomycetaceae  Genre: Candida  Espèce: <i>Candida albicans</i></p>	<p><i>Candida albicans</i> est un champignon unicellulaire mesurant de 4 à 6 µm de long, qui se reproduise par bourgeonnement. C'est l'espèce la plus virulente. Elle est commensale des muqueuses oro-pharyngée, gastro-intestinale, génito-urinaires et peut occasionnellement coloniser la peau</p>
<p style="text-align: center;"><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Domanie : Dacteria  Division : Firmicutes  Ordre : bacillales  Famille: Staphylococcaceae  Genre: Staphylococcus  Espèce : Staphylococcus aureus</p>	<p>Des coques Gram positif arrondis d'environ 1µm de diamètre, immobile, dépourvus de spores et de capsules : ils apparaissent le plus souvent en amas dit « grappes de raisin ». Ils peuvent également être isolés, par paires ou en très courte chaîne.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Salmonella sp</i></p>	<p>D : Bacteria  E : Bacteria  C : Gamma proteobacteria</p>	<p>Bacille de 1-6µm de long sur 0,3 à 1µm, mobiles par ciliature peritriche. Elle ne présente pas de capsule.</p>

<p><i>Salmonella sp</i></p>	<p>O: Enterobacterales</p> <p>F: Enterobacteriaceae</p> <p>G: Salmonella enterica / Salmonella bongori</p>	<p>Caractérisée par la fermentation de glucose avec production de gaz (sauf <i>S.typhi</i>), ce sont des bactéries enteropathogènes invasives elle provoque la destruction de la bordure en brosse des cellules intestinales.</p>
<p><i>E.coli</i></p>	<p>D : Bacteria</p> <p>E : Bacteria</p> <p>C : Gamma proteobacteria</p> <p>F: Enterobacteriaceae</p> <p>G: <i>Escherichia</i></p> <p>E: <i>E.coli</i></p>	<p><i>E. coli</i> également appelé colibacille et abrégée en <i>E. coli</i>, une bactérie intestinale (Gram négatif) des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80% de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'<i>E. coli</i> peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites.</p>

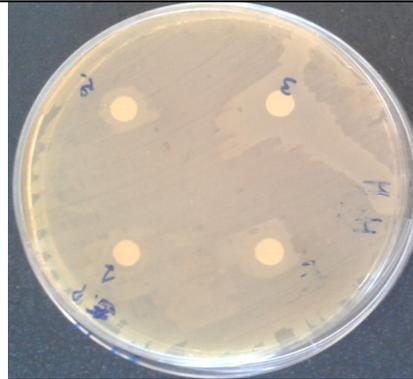
**Annexe 5 :**

<p><i>Salmonella</i></p>	 A petri dish containing a bacterial culture. The agar surface is covered with numerous small, white, circular colonies. Several colonies are marked with handwritten numbers: '3' at the top, '2' on the left, '4' on the right, and '2.P' at the bottom. The colonies appear to be of varying sizes and are distributed across the surface.
<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	 A petri dish containing a bacterial culture. The agar surface is covered with numerous small, white, circular colonies. Several colonies are marked with handwritten numbers: '3' at the top, '4' on the right, '2' on the left, and 'H-1' at the bottom. The colonies appear to be of varying sizes and are distributed across the surface.
<p><i>Aspergillus flavus</i></p>	 A petri dish containing a bacterial culture. The agar surface is covered with numerous small, white, circular colonies. Several colonies are marked with handwritten numbers: '5' at the top, '2' on the right, and 'A.F.P' on the left. The colonies appear to be of varying sizes and are distributed across the surface.

*Aspergillus ochraceus*



*E.coli*



*Salmonelle*



*Staphylococcus aureus*



## Résumé

Le travail que nous avons réalisé a été consacré à l'étude de la teneur en phénols totaux et flavonoïdes l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques de deux plantes médicinales très répandue dans le Nord Algérien : pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.), pin pignon (*Pinus pinea* L.).

Les teneurs en polyphénols ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. En outre, la détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé. Les résultats de la teneur en composés phénolique déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est de (7,99 mg/g); (3,71 mg/g) pour les extraits de *Pinus pinea* L et *Pinus halepensis* Mill, respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode  $AlCl_3$ , leur teneur est de 2,17 mg/g et 0,80 mg/g dans les extraits de *Pinus pinea* L et *Pinus halepensis* Mill, respectivement. L'activité antimicrobienne a été déterminée sur Sept souches microbiennes, l'extrait aqueux de *Pinus halepensis* Mill. S'est montré active contre les trois bactéries testées, à savoir: *Escherichia coli* avec une valeur CMI de (900µg/ml), *Staphylococcus aureus* avec une CMI de (1000µg/ml), et *salmonella* avec une CMI de (1000µg/ml). *Candida albicans* avec une CMI de (800µg/ml), quant au *Pinus pinea* L. inefficace pour contre les bactéries, elle s'est montrée très active contre *Aspergillus niger* avec une CMI de (1500µg/ml), et *Aspergillus flavus* avec une CMI de (1700µg/ml), *Aspergillus ochraceus* avec une de CMI (1500µg/ml).

**Mots clés:** Polyphénols, Flavonoïdes, *Pinus halepensis* Mill, *Pinus pinea* L., pouvoir antibactérien, Pouvoir antifongique.

## Summary

The work we carried out was devoted to studying the total phenol and flavonoid content of the antimicrobial activity of the phenolic extracts of two medicinal plants very widespread in the north of Algeria: Alep pine (*Pinus halepensis* Mill.), goupille pignon (*Pinus pinea* L.).

The polyphenol contents were determined by spectrophotometric techniques. Furthermore, the determination of the antimicrobial activity was carried out by the diffusion method of the disks in agar medium. The results of the phenolic compound content determined using the Folin-Ciocalteu reagent is the (7,99 mg/g); (3,71 mg/g), For the extracts of *Pinus pinea* L. and *Pinus halepensis* Mill., respectively. Flavonoids were evaluated using the  $AlCl_3$  method, their content was 2.17 mg / g and 0.80 mg / g in the extracts of *Pinus pinea* L. and *Pinus halepensis* Mill, respectively. Antimicrobial activity was determined on seven microbial strains, the aqueous extract of *Pinus halepensis* Mill. Was found to be active against the three bacteria tested: *Escherichia coli* with a MIC of (900 µg / ml), *Staphylococcus aureus* with a MIC of (1000 µg / ml), and *Salmonella* with a MIC of (1000 µg / ml). *Candida albicans* with a MIC of (800µg / ml), with respect to *Pinus pinea* L. Ineffective against bacteria, it has been very active *Aspergillus niger* with a MIC of (1500µg / ml), and *Aspergillus flavus* with MIC (1700µg / ml), *Aspergillus ochraceus* with MIC (1500µg / ml).

**Key words:** Polyphenols, Flavonoids, *Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., antibacterial power, Antifungal power.

## ملخص

قد كرس العمل الذي قمنا به دراسة إجمالي الفينولات والفلافونيدات ونشاط مضادات الميكروبات من المستخلصات الفينولية لنبتين طبييتين المتواجدين على نطاق واسع في شمال الجزائر: الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis* Mill.) والصنوبر المظلي (*Pinus pinea* L.).

تم تحديد محتويات البوليفينول بواسطة تقنيات طيفية. وبالإضافة إلى ذلك، تم إجراء تحديد نشاط مضادات الميكروبات بطريقة نشر الأقراص في الوسط الهلامي.

حددت نتائج المحتوى الفينولي باستخدام الكاشف Folin- Ciocalteu (7.99 ملغ / غ)؛ (3.71 ملغ / غ) في مستخلصات من الصنوبر الحلبي والصنوبر المظلي على التوالي .

تم تقييم الفلافونيدات باستخدام طريقة  $AlCl_3$ ، كان مضمونها 2.17 ملغ / غ و 0.80 ملغ / غ في مستخلصات من الصنوبر الحلبي والصنوبر المظلي، على التوالي.

تم تحديد النشاط البكتيري على سبعة سلالات جرثومية، المستخلص المائي للصنوبر الحلبي. أثبتت فعالية ضد البكتيرياات ثلاثة المختبرة، وهي *Escherichia coli* مع قيمة CMI (900 µg/ ml) ، المكورات العنقودية الذهبية مع CMI (1000 µg/ ml)، والسالمونيلا مع CMI (1000 µg/ ml) مع *Candida albicans* (800µg/ ml) ، أما بالنسبة للصنوبر الحلبي فقد أظهر فعالية ضد البكتيريا، مقارنة بالنوع *Pinus pinea* الذي كان غير فعال ضد البكتيريا، ونشطا للغاية ضد *Aspergillus niger* مع CMI (1500µg/ ml)، و *Aspergillus flavus* مع CMI (1700µg/ml)، مع *Aspergillus ochraceus* (1500µg/ ml) .

**الكلمات الرئيسية:** المستخلص المائي، النقع، البوليفينول، الفلافونويد، الصنوبر الحلبي، الصنوبر المظلي، مضاد البكتيريا، مضاد الطفيليات.