



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique



Université Abbes LAGHROUR, Khenchela
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie moléculaire et cellulaire

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : Sciences biologiques
OPTION: Microbiologie Appliquée

Thème

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité
antibactérienne *in vitro* des extraits de la plante
Pinushalepensis Mill.**

Présenté par

LEBSIR Rabiha

MAHSOUDI Cherifa

Soutenu le : 02 juillet 2017

Devant le jury

Président : M^r HABIBATNI Sofiane MAA Université Abbes LAGHROUR, Khenchela

Examineur : M^{elle} BOUTAFRA soumia MAA Université Abbes LAGHROUR, Khenchela

Rapporteur : M^{elle} DELLAA Yasmina MAA Université Abbes LAGHROUR, Khenchela

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

*Nous remercions particulièrement notre promoteur Melle Yasmina **DELLAA** pour avoir proposé et dirigé ce travail et pour toute l'aide qu'elle a fournie au cours de la préparation de ce mémoire.*

Mes vifs remerciements vont également aux membres de jury :

***Mr HABIBATNI Soufian**, Maitre assistant A à l'Université Abbès Laghrour Khenchela qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. Nous le remercions également profondément pour toute l'aide précieuse qu'il a déployée pour mener à bien la partie expérimentale.*

***A Melle BOUTARFA Soumia** maitre assistant à l'Université Abbès Laghrour, nous exprimons notre reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous tenons également à remercier **Mr BOUSSAA Abd Elhalim** et **Mr ZERJEB Azzedine** pour toute leur aide si précieuse.*

Nos remerciements vont à tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'Université Abbès Laghrour, Khenchela

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation du présent document.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents, la femme la plus patiente, ma très chère mère, source d'affection, de courage et d'inspiration qui a autant sacrifié pour me voir atteindre ce jour.

Mon idéal, l'être le plus généreux, mon chère père, source de respect, en témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien incessant qui m'a toujours apporté, qui ont été toujours à mes côtés pour terminer mes études.

*Merci beaucoup **Papa** et **Maman** je vous aime beaucoup.*

Qu'Allah vous garde pour moi.

*Mon marie **Karim** pour ta compréhension et ton aide précieuse dans les moments difficiles.*

*A ma fille **Sirine** ma raison d'existence dans la vie et qui illuminé ma vie.*

*A mes chère frères **Abdrrahim**, **Mohamed Said** et son fils **Abd elmoummen** je vous aime beaucoup.*

*A mes beaux-parents, mes beau frères et mes belles sœurs **Souad** et **Nadia** et leurs enfant **Wail**, **Chawki**, **Aya**, **Mohamed** et **Alaa**.*

*Une spéciale dédicace à mes amies **Cherifa**, **Soumia**,*

Rabha

DÉDICACES

*Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et
miséricordieux,*

Je dédie ce modeste travail :

*A mon père et ma mère. Aucun hommage ne pourrait être à la
hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler, mes
parents qui ont su construire pour moi un monde parfait.*

Qu'ALLAH leur procure bonne santé et longue vie.

*A mes adorables soeurs: **Nasira, Chaima, Hafidha, Widad,
Besma, Nawal et Hadjer** vous avez toujours été présentes par
vos bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été
d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et
personnelle Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de
bonheur, de santé et de réussite.*

*A mes frères: **Rafaii, Adel, Samir, Abderazak, Salehet
Nadjmeddin***

*A mon binôme que j'adore **Rabhaet** sa famille*

*A mes chères amies : **Hakima, Warda, Fatima, Hadjer, Souha,
Soumia, Aida, Hada, Zahwa, Ghania, Karima, Lamia, Manar,
Mobaraka, Chahra, Samia, Ahlem, Amel, Houda, Amira,
Fatiha, Ibtessem, Warda***

A toute ma famille

*A toute la promotion de master microbiologie **KHENCHÉLA
2016 /2017***

*A tous mes chers enseignants et enseignantes, surtout M^r
Zeggada Hamza que ce travail soit un témoignage de ma
gratitude et mon profond respect à vous.*

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

CHERIFA

Table de matière

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Résumés.....	iv
Introduction.....	1
Première partie : Etude bibliographique	
<i>Chapitre I : Généralité sur Pinushalepensis Mill.</i>	
I.1. Généralité sur les plantes médicinales.....	3
I.2. La plante <i>Pinushalepensis</i>	3
I.2.1. Présentation de la famille des <i>Pinaceae</i>	3
I.2.2. Présentation du genre <i>Pinus</i>	3
I.2.3. Position systématique de l'espèce <i>Pinushalepensis</i> Mill.....	4
I.3. Description botanique.....	4
I.3.1. Description de l'arbre.....	4
I.3.2. Feuilles.....	5
I.3.3. Les fruits.....	5
I.4. Répartition géographique du pin d'Alep.....	6
I.4.1. Répartition du pin d'Alep dans le monde.....	6
I.4.2. Répartition du pin d'Alep en Algérie.....	7
I.4.2.1. Les forêts du Tell.....	7
I.4.2.2. Le Tell algérois.....	8
I.4.2.3. Les forêts littorales.....	8
I.4.2.4. Les Pinèdes de l'Atlas saharien.....	8
I.4.2.5. Les forêts des Aurès Nememcha.....	8
I.5. Exigences écologiques de l'espèce.....	8
I.5.1. Exigences climatiques.....	8
I.5.2. Exigences édaphiques.....	9
I.6. Phénologie de l'espèce.....	9
I.7. Intérêt économique de l'espèce.....	9
I.8. Utilisations traditionnelles.....	10
II.1. Généralités sur les métabolites primaires et secondaires.....	11
II.2. Rôle des métabolites secondaires.....	11
II.3. Les différentes classes de métabolites secondaires.....	12

II.3.1. Les hétérosides.....	12
II.3.2. Les composés phénoliques.....	12
II.3.2.1. Les coumarines.....	12
II.3.2.2. La lignine.....	12
II.3.2.3. Les flavonoïdes.....	13
II.3.2.4. Les tanins.....	14
II.3.3. Les alcaloïdes.....	15
II.3.4. Les huiles essentielles.....	15
II.3.4.1. Composition chimique.....	16
A. les monoterpènes.....	16
B. Les sesquiterpènes.....	16
II.3.4.2 Mode d'extraction.....	16
A. L'hydrodistillation.....	16
B. Extraction par solvants.....	17
C. Extraction par expression.....	17
D. Entraînement à la vapeur sèche.....	17
II.3.4.3. Propriétés biologiques.....	18

Chapitre III : Activité antibactérienne

III.1. Généralités sur les bactéries.....	19
III.2. Culture des bactéries.....	19
III.3. Les antibiotiques.....	19
III.4. Modes d'action des antibactériens.....	20
III.5. Activité antibactérienne des extraits des plantes.....	20
III.6.Evaluation de l'activité antibactérienne.....	21
III.6.1. Méthode de l'aromatogramme.....	21
III.6.2. Méthode de diffusion en puits.....	22
III.6.3. Méthode de dilution (sur milieu liquide).....	22
III.6.4. Méthode de micro-atmosphère.....	22
III.7. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide.....	22
III.8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).....	23

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1. Matériel.....	24
--------------------	----

I.1.1. Matériel biologique.....	24
I.1.1. 1. Matériel végétal.....	24
I.1.1.2. Souches bactériennes testées.....	24
I.1.2. Matériel de laboratoire.....	25
I.1.2.1. Les milieux de culture.....	25
I.1.2.2. Les produits chimiques.....	25
I.1.2.3. L'appareillage utilisé.....	25
I.1.2.4. Outils et consommables.....	25
I.2 Méthodes	25
I.2.1. Méthodes d'extraction.....	25
I.2.1.1. Extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation	25
A. Principe.....	25
B. Procédé d'extraction.....	26
C. Détermination du rendement d'extraction.....	27
II.1.1.2. Extraction par Soxhlet.....	27
A. Principe.....	27
B. Mode opératoire.....	28
I.2.2. Screening phytochimique.....	29
I.2.2.1. Mise en évidence des saponosides (saponines)	29
I.2.2.2. Mise en évidence des alcaloïdes.....	29
I.2.2.3. Mise en évidence des tanins.....	30
I.2.2.4. Mise en évidence des flavonoïdes.....	30
I.2.3. Etude de l'activité antibactérienne.....	30
I.2.3.1. Principe.....	30
I.2.3.2. Mode opératoire.....	31
A. Préparation des disques.....	31
B. Préparation des pré-cultures.....	31
C. Préparation de l'inoculum.....	31
D. Ensemencement.....	31
E. Dépôt des disques.....	32
F. Incubation et lecture.....	32
I.2.4. Détermination des Concentrations minimales inhibitrices (CMI)	32
I.2.5. Détermination des concentrations minimales bactéricides.....	33
I.2.6. L'analyse statistique.....	34

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Rendements des extraits.....	35
II.2. Test de Screening phytochimique.....	36
II.3. Test de l'activité antibactérienne.....	38
II.3.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	38
II.3.2. Activité antibactérienne des extraits de <i>Pinushalepensis</i> Mill.	41
II.4. Détermination des paramètres antibactériens (CMI et CMB).....	43
II.4.1. L'extrait d'éther de pétrole (EtP)	44
II.4.2. L'extrait chloroformique (Chl)	44
II.4.3. L'extrait d'AcEt.....	45
II.4.4. L'extrait méthanolique (MeOH)	47
II.4.5. Les huiles essentielles (HE)	47
Conclusion et perspectives.....	50
Références bibliographiques.....	51
Annexe	
Résumé	

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré celsius

AcEt :Extrait d'Acétate d'éthyle

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : la norme de l'Association Française de Normalisation

AlCl₃ :Chlorure d'aluminium

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphates

BaCl₂ : Chlorure de Barium

BN : bouillon nutritive

Chl :Extrait de chloroforme

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentration minimale inhibitrice

CO₂ :Dioxyde de carbone

CoA :Coenzyme A

DMSO : diméthyle sulfoxide

DO : densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

EtP : Extrait d'éther de pétrole

FeCl₃ : trichlorure de fer

GN : Gélose nutritive

H₂O : Eau

H₂SO₄: Acidesulfurique

ha :hectare

HCl : Acide chlorhydrique

HE : Huile essentielle

M : masse d'huile essentielle en gramme

m0 : masse de la matière végétale

MeOH :Extrait de méthanol

MH : Muller Hinton

N : Normalité

N° : Numéro

-NH₂-NH- : fonction amine

nm : nanomètre

OH : groupement hydroxyle

pH :potentiel Hydrogène

Rdt : Rendement en Huile Essentielle

-SH : fonction thiol

µL : Microlitre

UFC :Unité Formant une Colonie

Liste de figures

N°	Titre	Page
1	Aspect général d'un arbre de pin d'Alep	5
2	Aguilles et cônes de pin d'Alep	5
3	Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne	6
4	Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie.	7
5	Représentation schématique illustrant les relations entre quelques métabolites primaires et secondaires	11
6	Structure de base des flavonoïdes	13
7	Structure des tanins	14
8	Mode d'action des antibiotiques	20
9	Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	26
10	Dispositif d'extraction Clevenger	27
11	Schéma illustrant le montage de Soxhlet	28
12	Montage expérimental d'extraction Soxhlet	29
13	Principe de l'aromatogramme	30
14	La méthode de microdilution (microplaque)	33
15	Détermination de la CMB.	34
16	Rendement d'extraction des différents extraits.	36
17	Résultats de screening phytochimique.	38
18	La sensibilité des bactéries testées contre les huiles essentielles de <i>Pinushalepensis</i> Mill.	40
19	La sensibilité des bactéries testées contre les extraits de <i>Pinushalepensis</i> Mill.	43
20	Concentration minimale inhibitrice d'AcEt	46
21	Résultats de CMB	49

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Classification du pin d'Alep	4
2	Caractéristiques des différents extraits	35
3	Résultats des tests phytochimiques sur les feuilles de <i>Pinushalepensis</i> Mill.	37
4	Diamètre des zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Pinushalepensis</i>	39
5	Diamètre des zones d'inhibition des quatre extraits de <i>Pinushalepensis</i>	41
6	CMI et CMB de l'extrait EtP	44
7	CMI et CMB de l'extrait Chl	45
8	CMI et CMB de l'extrait AcEt	46
9	CMI et CMB de l'extrait MeOH	47
10	CMI et CMB de l'huile essentielle(HE)	48

Résumé

L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits organiques de la plante médicinale *Pinus halepensis* Mill. Ses extraits organiques sont obtenus par Soxhlet en utilisant quatre solvants de polarité croissante : l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Les rendements respectifs sont : 1,44 %, 10,12 %, 5,26 % et 20,41 %. Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Le rendement en huile essentielle (HE) a fourni un taux de 0,96%.

L'analyse phytochimique réalisée a permis de constater la présence des quatre grands groupes chimiques : les tanins, les flavonoïdes, les saponines et les alcaloïdes dans l'extrait MeOH alors que l'extrait EtP ne contient que les saponines ; tandis que l'extrait AcEt contient tous les familles recherchées à l'exception des alcaloïdes. L'extrait Chl ne contient que les saponines et les tanins.

L'activité antibactérienne est déterminée sur huit souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disque. Les résultats trouvés ont montré que l'extrait MeOH exerce la plus forte activité vis-à-vis des huit souches testées, à l'inverse de l'extrait EtP qui est le moins actif. Les huiles essentielles exercent une forte activité antibactérienne sur les souches Gram positif par rapport aux Gram négatif. Tous les extraits organiques ont un effet sur les bactéries testés sauf sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les CMI et les CMB ont été déterminées sur milieu liquide. La comparaison entre les valeurs des CMI et CMB a montré que l'huile essentielle a un effet bactéricide moyen vis-à-vis les souches testées tandis que les extraits EtP et Chl ont un effet bactériostatique mais l'extrait AcEt exerce d'une part un effet bactériostatique vis-à-vis certaines souches et d'autre part un effet bactéricide contre d'autres souches et l'extrait MeOH exerce un effet bactéricide envers les souches testées.

Mots clés : *Pinus halepensis* Mill., screening phytochimique, extraits organiques, huiles essentielles, activité antibactérienne, CMI, CMB.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة التحليل الكيميائي النباتي وتقييم النشاط ضد المكروبي للزيوت الاساسية و المستخلصات العضوية للنبتة الطبية *Pinus halepensis* Mill. تم الحصول على المستخلصات العضوية بواسطة Soxhlet باستخدام أربعة مذيبات متزايدة الاستقطاب: إيثير البترول، والكلوروفورم، أسيتات الإيثيل والميثانول . كان المردود: 1.44٪، 10.12٪، 5.26٪ و 20.41٪ على الترتيب. تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق التقطير البخار في جهاز Clevenger. كان المردود من الزيت الأساسي بنسبة 0.96٪.

كشفت التحليل الكيميائي النباتي المنجز وجود أربع مجموعات كيميائية: الثانان ومركبات الفلافونويد، الصابونين وقلويدات في مستخلص MeOH، بينما مستخلص EtP يحتوي على الصابونين فقط، في حين ان مستخلص AcEt يحتوي على جميع العائلات المطلوبة باستثناء قلويدات و مستخلص Chl يحتوي فقط على الصابونين والثانان.

جرب النشاط ضد الميكروبي على ثمانية سلالات بكتيرية، باستعمال طريقة الانتشار على القرص. وقد أظهرت النتائج أن مستخلص MeOH يمارس أقوى نشاط ضد بكتيري على الثمانية سلالات المختبرة و في المقابل فان مستخلص EtP هو الأقل نشاطا في حين أن الزيوت الأساسية لها نشاط ضد بكتيري قوي على السلالات موجبة الجرام مقارنة بالسالبة الجرام. جميع المستخلصات العضوية لها تأثير على البكتيريا المختبرة باستثناء *Pseudomonas aeruginosa*.

تم تحديد التراكيز الدنيا المثبطة و القاتلة على وسط زراعة سائل. أظهرت المقارنة بين قيم التراكيز الدنيا المثبطة و القاتلة أن الزيوت الأساسية لها مفعول مثبط مع السلالات المختبرة بينما المستخلصان EtP و Chl فلهما مفعول مثبط في حين ان مستخلص AcEt فله من جهة مفعول مثبط ضد بعض السلالات و من جهة أخرى مفعول قاتل ضد سلالات أخرى اما مستخلص MeOH فله تأثير قاتل ضد السلالات التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: *Pinus halepensis* Mill ، التحليل الكيميائي النباتي، المستخلصات العضوية، الزيوت الأساسية، النشاط ضد البكتيري، التراكيز الدنيا المثبطة، التراكيز الدنيا القاتلة

Abstract

The aim of this work is the phytochemical study and to evaluate the antibacterial activity of essential oil and the organic extracts of the medicinal plant *Pinus halepensis* Mill. Its organic extracts were obtained by Soxhlet using four solvents of increasing polarity: petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and methanol. The yields were: 1.44%, 10.12%, 5.26% and 20.41% respectively. The essential oils were extracted by hydrodistillation in a Clevenger apparatus. The yield of essential oil (HE) provided a rate of 0.96%.

The phytochemical analysis revealed the presence of four major chemical groups: tannins, flavonoïds, saponins and alkaloids in the MeOH extract, while the EtP extract contains only saponins, whereas the AcEt extract contains all the families with the exception of alkaloids. The Chl extract contains only saponins and tannins.

The antimicrobial activity was determined on eight bacterial strains, according to the disk diffusion method. The results showed that the MeOH extract exerts the strongest antibacterial activity against the eight strains tested, and on the contrary, the EtP extract is the least active. While the essential oils exert a strong antibacterial activity on the Gram strains positive compared to Gram-negative. All organic extracts have an effect on the bacteria tested except on *Pseudomonas aeruginosa*.

CIMs and CMBs were determined on a liquid medium. The comparison between the CIM and CMB values showed that the essential oil has a medium bactericidal effect against the tested strains whereas the EtP and Chl extracts have a bacteriostatic effect, but the AcEt extract exerts a Bacteriostatic effect on certain strains and on the other hand a bactericidal effect against other strains and the MeOH extract exerts a bactericidal effect on the strains tested.

Key words: *Pinus halepensis* Mill, Phytochemical screening, organic extracts, essential oil, antibacterial activity, CMI, CMB.

Introduction

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire de milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (Diatta *et al.*, 2013 ; Hammoudi, 2015).

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes ...etc (Boudjouref, 2011).

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée (Kheyret *et al.*, 2014). Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal du pays, se trouve le genre *Pinus*, qui est largement distribué surtout dans les régions méditerranéennes. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activité thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues il y a l'espèce *Pinus halepensis* Mill.. Cette plante est très utilisée pour traiter les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires...etc (Fekih, 2015).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles et les différents extraits organiques de *Pinus halepensis* Mill.

Cette étude a pour objectifs essentiels :

- L'extraction et la mise en évidence des différents métabolites secondaires présents dans les aiguilles de *Pinus halepensis* Mill ;
- La détection des différentes familles de composés existantes dans la partie aérienne de la plante par les réactions de test de Screening phytochimique ;
- L'étude de leurs activités antibactériennes vis-à-vis de huit souches bactériennes et la détermination de la CMI et la CMB.

Le mémoire est divisé en deux principales parties: une partie bibliographique et une partie expérimentale. La partie bibliographique comprend trois chapitres ; le premier est une revue générale sur l'espèce *Pinushalepensis* Mill. en tant que plante médicinale et ses propriétés ainsi qu'une étude botanique de l'espèce. Le deuxième chapitre traite des métabolites secondaires des végétaux alors que le troisième étudie l'activité antibactérienne.

La partie expérimentale est subdivisée en deux chapitres : le premier est consacré à la présentation du matériel végétal utilisé et du matériel du laboratoire, en plus des diverses méthodes utilisées, le second présente la discussion des résultats. Enfin, le manuscrit s'achève par une conclusion générale et les perspectives. Le document est finalisé par la liste des références bibliographiques et les annexes.

Première partie :

Etude

bibliographique

Chapitre I :
Généralitéssur
Pinushalepensis
Mill.

Généralités sur Pinushalepensis Mill.

I.1. Généralité sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales constituent une composante fondamentale pour l'avenir du système de santé dans le monde; elles demeurent une source inépuisable de substances biologiquement actives. La phytothérapie est une discipline qui tend toujours à se renouveler, car la recherche de nouveaux médicaments est continuelle (Sadou *et al.*, 2015). Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme une "drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses". Une "drogue végétale" est une plante ou une partie de plante, utilisées en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais. L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments (Mohammedi, 2013).

I.2. La plante *Pinus halepensis*

I.2.1. Présentation de la famille des *Pinaceae*

La famille des Pinacées (*Pinaceae*), ou Abiétacées, est une famille de plantes gymnospermes, également connus sous le nom de résineux, qui compte 220 à 250 espèces réparties en 11 genres. Elles sont originaires et peuplent abondamment les régions tempérées du globe terrestre (Chagne, 2004). Ce sont des arbres d'une hauteur allant de 2 à 100 m, leurs feuilles sont sous forme d'aiguilles vertes, piquantes ou non, plus ou moins longues, attachées seules aux rameaux, ou réunies par 2 ou en rosettes. Les Pinacées sont des "conifères", portant des cônes, comme organes de reproduction qui ne sont ni des inflorescences ni des infrutescences. Les cônes mâles, ressemblant à des chatons dressés, bien que petits, produisent une grande quantité de pollen jaune à jaune orangé dispersé par le vent, alors que les cônes femelles, plus gros, dressés sur les rameaux ou pendants au-dessous, contiennent les ovules nus, qui, après fécondation, deviennent des graines ailées. Cette famille est représentée en Algérie par trois genres : le Genre *Abies* (le sapin), le Genre *Cedrus* (le cèdre) et le Genre *Pinus* (les pins) (Fekih, 2014).

I.2.2. Présentation du genre *Pinus*

Les pins du genre *Pinus*, appartiennent à la famille des *Pinaceae*. Il s'agit d'arbres dont le développement et le port sont très variés (Lieutaghi, 2004). Le pin d'Alep est une plante monoïque à fleurs mâles et femelles séparées, situées sur le même individu; et groupées en épis (More et White, 2005). L'inflorescence femelle ou cône, une fois la fécondation accomplie, mûrit en deux (rarement en trois) ans. Après la formation des graines et l'ouverture des écailles, le cône peut tomber ou rester sur l'arbre. Les graines sont souvent ailées, ce qui facilite leur dissémination par le vent et l'extension de leur aire de distribution.

Le genre *Pinus* est séparé en deux sous-genres : *Pinus* (2 à 3aiguilles) et *Strobus* (5 aiguilles) qui regroupent un peu plus d'une soixantaine d'espèces. Ces sous genres sont divisés en sections, elles-mêmes subdivisées en sous-sections (Chaumeill, 2006).

I.2.3. Position systématique de l'espèce *Pinus halepensis* Mill.

Le Pin d'Alep ou *Pinus halepensis* est un conifère de la famille des *Pinacées* qui fut décrit pour la première fois par Duhamel, en 1755, sous le nom de *Pinus hierosolimitana*. Plus tard Philip Miller l'a redécrit, en 1768, sous le nom de *Pinus halepensis* Mill. (Panetsos, 1980 ; Nahal, 1962).

Les pins du genre *Pinus*, sont des conifères caractérisés par le nombre d'au moins 111 espèces qui ont été décrites dont beaucoup sont des essences forestières importantes (Lieutaghi, 2004). L'espèce *Pinus halepensis* Mill., porte le nom de pin d'Alep, en Français et *Aleppo Pine* en Anglais, c'est un pin à deux feuilles habitant la Région Méditerranéenne, appartenant au groupe *halepensis*, à la famille des *pinacées* (abiétacées), au genre *Pinus*, sous genre (*eupinus*), section *halepensis*, et sous-groupe *halepensis*. Ce groupe est représenté essentiellement par deux espèces *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus brutia* Ten. (Tableau 1) (Ladjal, 2012).

Tableau 1 : Classification du pin d'Alep

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement	<i>Gymnospermes</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Coniferales</i>
Famille	<i>Pinaceae</i>
Sous-famille	<i>Pinoideae</i>
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Halepensis</i> (Miller, 1768)
Subsp	<i>Halepensis</i>

(Ozenda, 2006).

I.3. Description botanique

Les aspects morphologiques et anatomiques du pin d'Alep firent l'objet d'un certain nombre d'études (Mirov, 1955 ; Nahal, 1962 ; Bellefontaine, 1979; Quezel, 2000; Ghanmi *et al.*, 2005).

I.3.1. Description de l'arbre

C'est l'arbre le plus répandu en Algérie, avec une surface avoisinant 900 000 hectares. Arbre toujours vert, vivace, d'environ 20 m de haut. L'écorce des jeunes sujets est lisse, de couleur gris argenté ; celle des arbres adultes est épaisse, profondément crevassée, de couleur noirâtre à rou-

geâtre. Les arbres jeunes sont de forme assez régulière, les plus âgés, dégarnis à la base, ont un houppier clair, plus dispersé et en forme de parasol, une cime irrégulière peu dense (Figure 1) (Fekih, 2014).



Figure 1 : Aspect général d'un arbre de pin d'Alep

I.3.2. Les feuilles

Pinus est caractérisé par la présence d'un appareil foliaire sous forme d'aiguilles pointues, longues ou courtes, réunies en groupes de 2, 3, 4 ou 5. Les aiguilles fines et souples sont réunies en pinceaux à l'extrémité des rameaux, mesurant 5 à 10 cm de long, larges au plus de 1 mm, de couleur vert jaunâtre (Figure 2) (Lieutaghi, 2004).

I.3.3. Le fruit

Les fruits sont des cônes verticillés de 8 à 12 cm de long, large de 3,5 à 4,5 cm, d'abord vert, puis deviennent rouge violacé, arrivé à maturité ils deviennent brun rougeâtre à jaunâtre apparaissant à l'automne sur les arbres adultes (Figure 2). Les écailles s'écartent à maturité, libérant des graines d'environ 7 mm de long, mates, munies d'une aile 4 fois plus longue qu'elles, persistante qui permet leur dissémination rapide et éloignée (Ladjal, 2012).



Figure 2 : Aiguilles et cônes de pin d'Alep

Le cône femelle a des écailles qui s'ouvrent temporairement pour recevoir le pollen, puis se referment pendant la fécondation qui se fait sous l'action de l'humidité ou suite à une immersion dans l'eau. La maturation de la graine prend 6 à 8 mois après la pollinisation dans la plupart des genres de *Pinaceae*, mais 18 à 24 mois, rarement plus, pour la plupart des pins. Les graines, triangulaires, sont de 10 à 15 mm de long, prennent des couleurs ternes tendant vers la marron, et munies d'aile longue, riches en résines (particularité des Pinacées) (Fekih, 2014).

I.4. Répartition géographique du pin d'Alep

I.4.1. Répartition du pin d'Alep dans le monde

Pinus halepensis est un arbre circumméditerranéen que l'on trouve à l'état spontané autour du bassin méditerranéen, sauf en Egypte. Mais c'est en Afrique du Nord qu'il semble avoir actuellement son centre de gravité, principalement en Algérie et en Tunisie où il constitue les massifs les plus importants (Nahal, 1986). Ses forêts occupent plus de 2,5 millions d'hectares réparties dans certains pays situés sur le pourtour de la Méditerranée (Figure 3) (Quézel, 2000).



Figure 3 : Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne (Fady *et al.*, 2003).

En Espagne, il constitue 15 % de la superficie boisée, surtout sur les chaînes littorales de Catalogne, de la région de Valence et Murcie. Aux îles Baléares, il monte jusqu'à 1200 m d'altitude. En France, il est fréquent en Provence et assez peu répandu et épars à l'Ouest du Rhône qu'il remonte jusqu'aux environs de Montélimar. En Corse, sa spontanéité est douteuse (région de Saint Florent). Il occupe quelques boisements en Syrie et au Liban (Kadik, 1987). Peu abondant en Italie, le Pin d'Alep se localise sous forme de massifs dans la province de Tarente, occupant quelques localités en Sardaigne et en Sicile. Il est peu représenté en Yougoslave, en Grèce, en Turquie, par des peuplements relativement importants en Palestine et en Jordanie (Figure 3) (Quézel et Barbero, 1992).

En Lybie, il existe dans quelques localités en Cyrénaïque littoral ; en Tunisie, il occupe 370.000 ha surtout sur les Monts de la dorsale tunisienne et au Maroc 65.000 ha dans le Rif, le moyen et le haut Atlas (Figure 3) (Ammari *et al.*, 2001).

I.4.2. Répartition du pin d'Alep en Algérie

En Algérie, d'après (Kadik, 1987), le pin d'Alep couvre 850.000 ha s'étend essentiellement dans la partie septentrionale du pays, exception faite de la région Nord orientale. C'est ainsi qu'il occupe de vastes peuplements en Oranie (Sidi-Bel-Abbès, Saida, Mascara Tlemcen, Tiaret, Ouarsenis) sur le Tell algérois (Médéa, Bibans), sur l'Atlas saharien (Monts des Ouled Nails). Dans le Constantinois, il est surtout localisé dans les Aurès et les Monts de Tébessa où il rejoint la Tunisie par la dorsale (Figure 4).

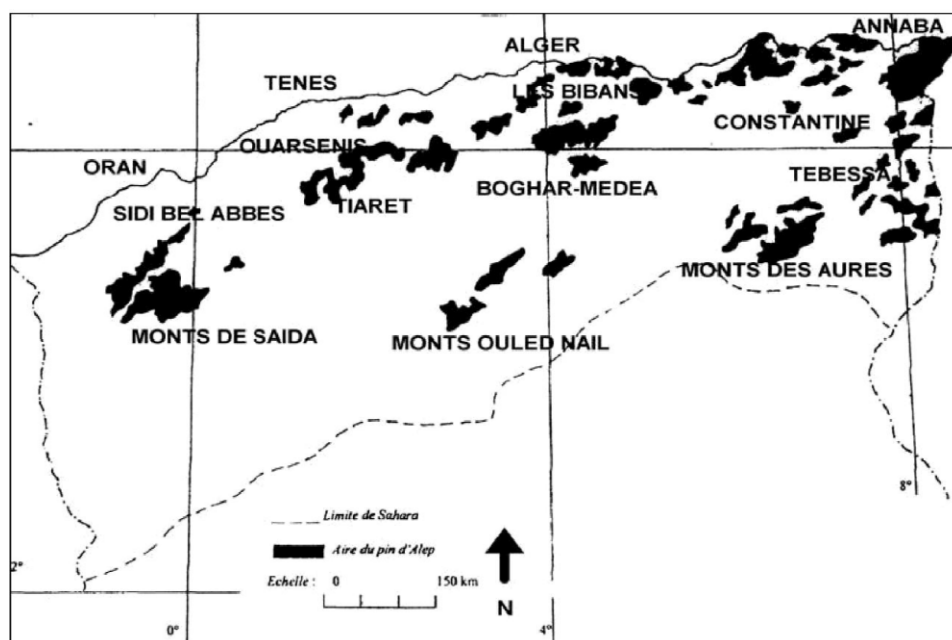


Figure 4 : Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie (Kadik, 1987).

I.4.2.1. Les forêts du Tell

Les forêts de Pin d'Alep sont constituées de trois blocs :

- A. Les forêts des Monts de Tlemcen : il occupe surtout le Tell méridional et les Monts de Slissen.
- B. Les forêts des Monts de Daïa : C'est une région fortement boisée, domaine par excellence du Pin d'Alep qui constitue un ensemble allant jusqu'aux portes de Sidi-Bel-Abbès. Les principaux massifs sont ceux de Tenira, Zegla, Touazizine, Guetarnia.
- C. Les forêts de Saida comprennent des futaies bien venantes, notamment celles de Fenouane, Djaâfra, Doui-Tabet, Tafrent (Figure 4).

I.4.2.2. Le Tell algérois

L'Atlas tellien part de l'Ouarsenis aux Bibans, il est dominé par les formations à Pin d'Alep et Chêne vert. Les massifs de l'Ouarsenis sont recouverts en grande partie par des futaies de Pin d'Alep et des taillis de chêne vert, le Thuya et le Genévrier oxycèdre accompagnent ces deux espèces principales. À l'Ouarsenis, se rattachent les forêts de Médéa, Berrouaghia et d'Ain Boucif qui en sont le prolongement.

Les forêts des Bibans comprennent principalement des peuplements des Ouled Okhriss et des Ksenna qui sont constitués de futaies renfermant les 9/10^{ème} de Pin d'Alep.

Le Tell constantinois ne comporte pas de massifs étendus de Pin d'Alep, et est en mélange au Chêne vert.

I.4.2.3. Les forêts littorales

Le Pin d'Alep sur le littoral algérois et le littoral oranais occupe une faible étendue. Le sahel d'Alger fait la transition avec la zone de chêne liège proprement dite et les zones forestières à Pin d'Alep, Thuya et Chêne vert.

I.4.2.4. Les Pinèdes de l'Atlas saharien

Les forêts de Pin d'Alep sont surtout localisées sur les montagnes jurassiques et crétacées des Monts des Ouled Nails. Les plus beaux peuplements sont situés sur les montagnes de Djelfa (Ain-Gotaia, Sénalba, Sahary). Près de Bou-Saada se trouve le peuplement forestier de Messaad. Les autres massifs sont ceux des Djellal, de Medjedel, Zemra et le Bou-Denzir.

I.4.2.5. Les forêts des Aurès Nememcha

Les forêts des Aurès sont dominées par le Pin d'Alep sur les versants Sud, ailleurs, cette essence est en mélange avec d'autres espèces (Chêne vert, Genévrier de Phénicie,...). Les plus beaux peuplements de Pin d'Alep sont situés entre 1000 et 1400 m d'altitude dans les massifs des Béni-Melloul, Béni-Oudjana et des Ouled yaagoub. Alors que le massif des Ouled Fedhala est dominé par le chêne vert. À Tébessa, les pineraies sont assez clairières, notamment celles des Ouled Sidi-Abid et de Bracha Allaouna. Le massif d'Ouled Sidi-Yahia Ben-Taleb est relativement bien venant.

I.5. Exigences écologiques de l'espèce

I.5.1. Exigences climatiques

Le pin d'Alep se rencontre dans les étages bioclimatiques méditerranéens : arides supérieurs, semi-arides, sub-humides et humides, il reste néanmoins une essence de l'étage semi-aride. C'est une espèce héliophile et xérophile ; se développe à des températures moyennes annuelles de 11 à

19 °C mais peut supporter exceptionnellement des températures de -15 à -18 °C de courte durée (Nahal, 1962). Il exige des précipitations annuelles de 350 à 700 mm ou 200 à 1500 mm (Quezel, 1986).

I.5.2. Exigences édaphiques

Le pin d'Alep se développe sur les substrats marneux, calcaires et calcaro-marneux (Quezel et Barbero, 1992) mais également sur les schistes et les micaschistes (sur littoral algérois) mais jamais sur les granites ou les gneiss. Il tolère très mal les sols sablonneux et pas du tout les nappes aquifères permanentes qui asphyxient son système racinaire (Quezel, 1986). Ses meilleurs peuplements sont situés sur des sols à réaction basique $7,5 < \text{pH} < 8,5$ mais on peut rencontrer des formations sur sols acides comme en Provence et en Sardaigne), surtout en position sublittorale (Molinier, 1954 cité par Quezel et Medail, 2003). Au nord méditerranéen, on le rencontre de 0 à 600 m d'altitude et au sud de 0 à 1400 m et même à 2600 m dans le Haut Atlas du Maroc (Bouguenna, 2011).

I.6. Phénologie de l'espèce

La croissance en hauteur de la pousse terminale du pin d'Alep se fait en deux temps : en automne, il développe un bourgeon terminal qui donnera naissance ensuite au printemps suivant à une pousse terminale (Serre, 1976 ; Nicault *et al.*, 2001).

Les cônes du pin d'Alep mûrissent au cours de la deuxième année et leurs graines sont libérées au cours de la troisième année (Nahal, 1962; Francelet, 1970). Suite à de fortes chaleurs, les écailles du cône s'ouvrent et les graines sont naturellement disséminées entre fin Août et fin Octobre (Francelet, 1970). Elles germent à la fin de l'automne ou au début du printemps (Calamassi *et al.*, 1984). Le pin d'Alep fructifie à l'âge de 10-12 ans, mais ses graines ne sont aptes à germer qu'à l'âge de 18 à 20 ans (Nahal, 1962).

I.7. Intérêt économique de l'espèce

Ecologiquement, *Pinus halepensis* est l'espèce forestière la plus importante dans de nombreux pays méditerranéens. Il est utilisé généralement dans des programmes de reboisement des sols dégradés (Maestre et Cortina, 2004), cas de la "ceinture verte" dans le sud de l'Algérie, où 1 million d'hectares ont été plantés de pins d'Alep il y a plus de 20 ans (Lahouati, 2000).

Son bois est utilisé en construction, industrie, menuiserie, bois et pâte à papier, pour l'étaillage des mines, la construction navale et la charpenterie. Le pin d'Alep donne environ 3 kg de résine par arbre et par an (Parajoannou, 1954 cité par Kadik, 1987).

La gemme pure contient 20 à 24 % d'essence de térébenthine et 75 à 80 % de cellophane, elle a aussi des usages médicaux (Kadik, 1987).

I.8. Utilisations traditionnelles

Le genre *Pinus* est très connu pour ses propriétés en médecine traditionnelle algérienne comme :

- Antiseptique puissant à action dynamisante ; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires.
- Rubéfiant et balsamique, efficace dans les affections pulmonaires : la grippe, la sinusite, les rhumatismes.
- Les sirops, les infusions, les tisanes et les jus de *Pinus halepensis* sont connus par leur effet balsamique pour vaincre les affections catarrhales du système respiratoire.
- les bourgeons de cette espèce sont utilisés en parfumerie et en savonnerie.
- Les graines de pin sont comestibles et utilisées en pâtisserie et confiserie ou peuvent être mangées crues en cassant leur coque (Bouazza, 2013).

Chapitre II:

*Les métabolites
secondaires*

II.1. Généralités sur les métabolites primaires et secondaires

L'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans un organisme est appelé "métabolisme". La plus grande partie du métabolisme du carbone et de l'énergie se retrouve dans les protéines, les acides nucléiques, les lipides et d'autres molécules qui sont communes à toutes les cellules et nécessaires à leur fonctionnement ainsi qu'à celui des organismes appelées "métabolites primaires". Mais chez de nombreuses plantes, une partie importante du carbone assimilé et de l'énergie emmagasinée, est prélevée afin de synthétiser des molécules organiques qui peuvent n'avoir aucun rôle manifeste dans la croissance et le développement. Ces molécules sont appelées "métabolites secondaires". Les métabolites secondaires se rencontrent généralement en faibles quantités et leur production peut être soit largement répandue soit limitée à certaines familles, ou à certains genres voire à certaines espèces particulières (Figure 5) (Hopkins, 2003). L'étude de leur synthèse par les végétaux se justifie d'autant plus que les animaux sont souvent incapables de les synthétiser et doivent les trouver dans leur alimentation (auxotrophie) (Heller *et al.*, 1998).

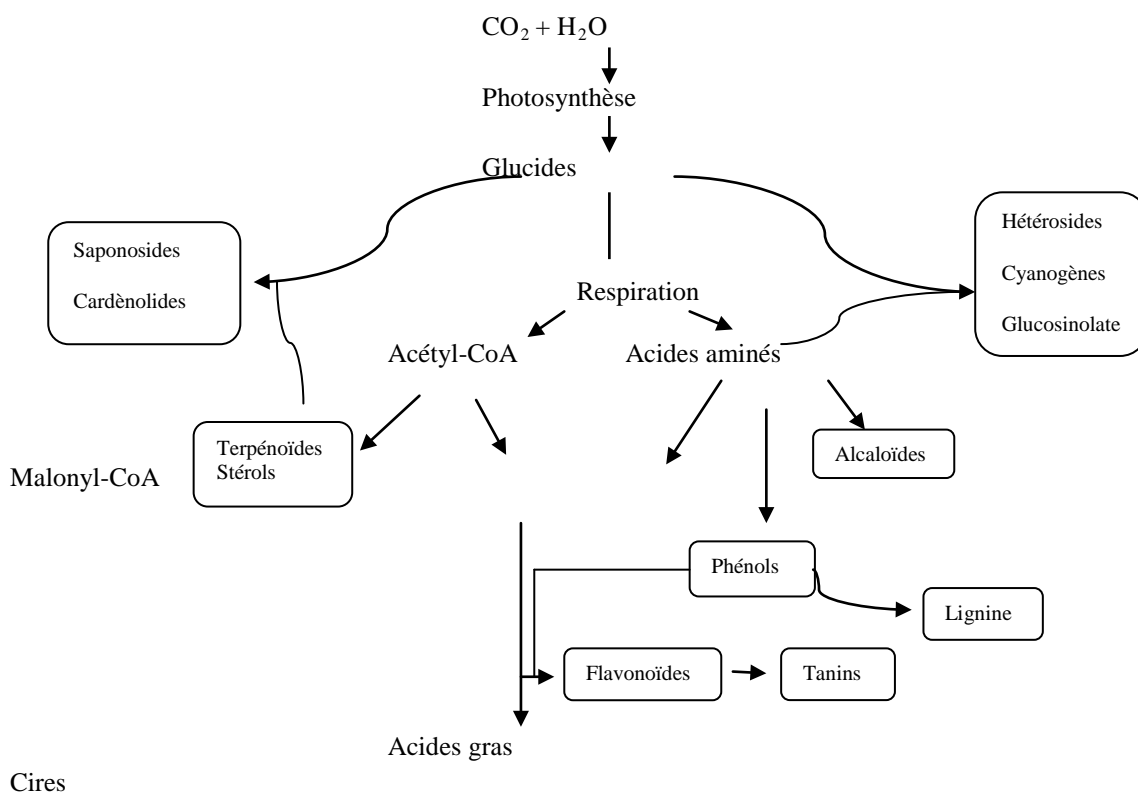


Figure 5 : Représentation schématique illustrant les relations entre quelques métabolites primaires et secondaires (rectangles) (Hopkins, 2003).

II.2. Rôle des métabolites secondaires

Leurs rôles sont multiples:

- Ils servent à réduire l'impact des insectes ou des animaux prédateurs ou bien exercent d'autres fonctions de protection ;

- Ils sont utilisés comme remèdes populaires, ou comme savons ou essences...etc ;
- Ils sont des produits médicaux, des colorants, des matières premières pour les industries chimiques (gommes, résines, caoutchouc) et comprennent aussi tout un ensemble de substances utilisées pour aromatiser aliments et boissons ;
- Ils sont utilisés contre les infections microbiennes et les herbivores, ou que l'attraction exercée sur les pollinisateurs et les agents qui permettent la dispersion des fruits, sont devenus des thèmes qui sont au centre de la recherche sur ces métabolites secondaires (Hopkins, 2003 et Belloum, 2007).

II.3. Les différentes classes de métabolites secondaires

II.3.1. Les hétérosides

Les hétérosides ou glycosides sont des composés renfermant une molécule glucidique, très souvent le β -glucose, liée par sa fonction réductrice (liaison glycosidique), à une autre molécule dont la nature peut être très variée, mais qui renferme toujours une fonction alcool ou phénol (-OH), amine (-NH₂-NH-) ou thiol (-SH). La liaison s'effectue avec élimination d'une molécule d'eau (Heller, 1998). Parmi les hétérosides les plus connues : les saponosides, les hétérosides cardiotoniques, les hétérosides cyanogènes et les glucosinolates (Hopkins, 2003).

II.3.2. Les composés phénoliques

La famille de métabolites secondaires issus des acides aminés aromatiques est habituellement connue sous le terme de composés phénoliques, polyphénols ou dérivés phénylpropanoïdes (Heller, 1998).

II.3.2.1. Les coumarines

Les coumarines constituent un groupe de lactones largement répandues, issues de la formation d'un cycle fermé à partir de l'acide hydroxycinnamique. La coumarine donne au foin fraîchement coupé son odeur douceâtre caractéristique. La scopolétine qui est la coumarine la plus fréquente chez les plantes supérieures, est souvent présente dans les enveloppes des graines. On suppose qu'elle est un inhibiteur de la germination qui doit être lessivé avant que la graine ne puisse germer (Hopkins, 2003).

II.3.2.2. La lignine

La lignine est un polymère fortement ramifié, formé par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes, la peroxydase. Les radicaux libres agissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine. Elle est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées. C'est un

très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, et il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations. Bien que la fonction de la lignine soit d'ordre structurel, elle a également été considérée comme agent chimique intervenant dans la défense des plantes (Hopkins, 2003).

II.3.2.3. Les flavonoïdes

Bien que le vert soit la couleur prédominante du monde végétal, c'est la coloration chatoyante des pétales de fleurs, des fruits, des bractées ou éventuellement des feuilles qui attirent surtout l'homme et une foule d'animaux vers les plantes. Ces teintes qui varient de l'écarlate, au rose, au violet et au bleu, sont dues à la présence de pigments dénommés "anthocyanes". Les anthocyanes appartiennent à un grand groupe de composés nommés flavonoïdes (Hopkins, 2003).

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (Kebieche, 2009).

Les flavonoïdes sont composés de trois cycles, nommés A, B et C. le cycle B et la chaîne à trois carbones (cycle C) sont issus de la voie de l'acide shikimique via la phénylalanine l'acide p-coumarique. Les six atomes de carbone du cycle A dérivent de l'acide malonique (Figure 6) (Hopkins,2003).

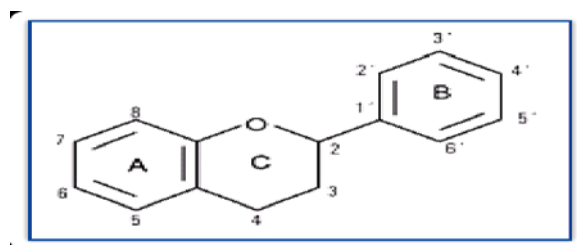


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes (Yakhlef, 2010).

En plus de leur rôle dans la pigmentation des végétaux, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêt, telles que des actions anti-oxydantes (Fiorucci, 2006), anti-inflammatoires (Bruneton, 1999 et Valérie, 2008), anti-hypertenseurs, anti-influenza, antifongiques et antiviraux (Morel, 2011) et antimicrobiennes (Kebieche, 2009).

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase (Ohemeng, 1993). L'étude de Sato (1995) a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* ... etc. (Akroum, 2011).

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne par un exemple bien explicites ; la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* selon deux mécanismes:

- Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité ;
- Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase (Dadi, 2009).

Dans les deux cas, l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement (Akroum, 2011).

II.3.2.4. Les tanins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour "tanner" les peaux d'animaux, autrement dit pour transformer une peau en cuir. Ces extraits contiennent des dérivés phénoliques qui se lient aux protéines et donc les dénaturent (Hopkins, 2003).

Les tanins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments (Figure 7) (Muanda, 2010).

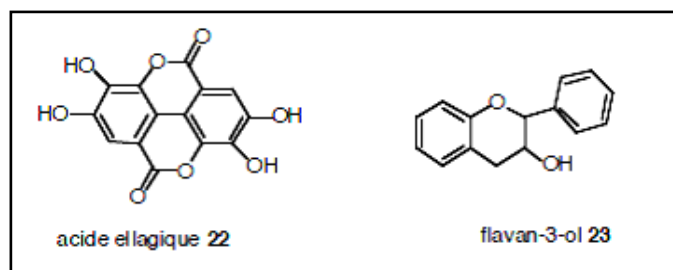


Figure 7 : Structure des tanins (Krief, 2004).

Actuellement, on distingue deux catégories de tanins :

- **Les tanins condensés** : sont des polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes carbone-carbone; ces liaisons ne sont pas hydrolysables mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines ;
- **Les tanins hydrolysables** : la structure de base des tanins hydrolysables est constituée d'un glucide, habituellement le glucose, dont un radical hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide gallique. Les résidus d'acide gallique se lient entre eux pour former un grand polymère réticulé (Hopkins, 2003).

Les tanins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales, dont certaines sont sporogènes, comme *Clostridium aminophilum*,

C. proteoclasterium, ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tanins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (Trease et Evans, 1987).

II.3.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille très hétérogène de métabolites secondaires qui présentent un intérêt de par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Leurs caractéristiques communes sont leur solubilité dans l'eau, la présence d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique. L'atome d'azote accepte souvent un proton, ce qui leur confère un caractère légèrement basique en solution (d'où leur nom d'alcaloïde). Le mot "alcaloïde" est pratiquement synonyme du mot "drogue" ; 10 des 12 drogues qui ont pour origine une plante et qui sont commercialement les plus importantes sont des alcaloïdes (Hopkins, 2003).

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leur structure, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques. Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (Bruneton, 1999).

II.3.4. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits du métabolisme secondaire produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes hydrophobes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (Padrini et Lucheroni, 1996 ; Hazzit, 2002).

Il est important de distinguer entre les huiles essentielles, les huiles fixes (huile d'olive...) et les graisses contenues dans les végétaux. En effet :

- Seules les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes et des graisses ;
- Elles se distinguent des huiles fixes par leurs composition chimiques et leurs caractéristiques physiques ;
- Elles sont fréquemment associées à d'autres substances comme les gommes et les résines (Abdelouahid et Bekhechi, 2010).

II.3.4.1. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$. Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (Hampson, et Svoboda, 1999).

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatile : mono- et sesquiterpènes (Bruneton, 1999).

A. Les monoterpènes

Constituants les plus simples de la série, les monoterpènes sont issus du couplage de deux unités "isopréniques". Ils peuvent être acycliques (mycène, ocimène), monocycliques (α et γ -terpinène, p-cymène) ou bicycliques (pinène, camphène, sabinène). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (citrus...) (Bruneton, 1999).

B. Les sesquiterpènes

Un grand nombre de sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs, ils peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles. Biologiquement, bon nombre de structures sesquiterpéniques sont des phytoalexines, d'autres semblent agir comme des régulateurs de croissance, d'autres enfin attirent les insectes ou agissent à l'encontre de ceux-ci comme des facteurs antinutritifs (Bruneton, 1999).

II.3.4.2. Mode d'extraction

A. Hydrodistillation

Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau distillée qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1999).

B. Extraction par solvants

La technique consiste à mettre le produit au contact d'un solvant qui est choisi en fonction de la matière première et des utilisations de l'extrait. Le solvant peut être de nature aqueuse ou organique (alcool, hexane, éther...) (Jeantetet *al.*, 2007 ; Lesley, 1996).

Cette technique est aussi utilisée avec des fleurs ne supportant pas la chaleur, la distillation ne convient que pour les végétaux dont le rendement en huile essentielle est suffisamment important. Le solvant lave la matière première qui subit après décantation et concentration, une distillation partielle. Ce solvant volatil est séparé de la "concrète" par filtrage, puis glaçage de -12°C à -15°C. La substance ainsi obtenue est à nouveau filtrée et concentrée à faible pression (Pingot, 1998).

C. Extraction par expression

Certaines essences peuvent être obtenues simplement par expression ; c'est le cas en particulier des essences d'agrumes. Ces fruits contiennent de grandes quantités de molécules hydrophobes qui se trouvent à l'intérieur de sacs oléifères ; le principe de l'extraction de ces huiles essentielles consiste à rompre ces poches à essence par un moyen mécanique ; l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par décantation ou centrifugation (Jeantet *et al.*, 2007).

D. Entraînement à la vapeur sèche

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats ; le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche a été mis au point. La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur sèche est pulsée. Les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent. Ces dernières sont alors vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigéré. La récupération de l'huile essentielle est la même que dans le cas de l'hydrodistillation (Benjilali, 2004).

II.3.4.3. Propriétés biologiques

- **Propriétés antibactérienne** : capacité des huiles essentielles à s'opposer à la reproduction des bactéries et les détruisant. Les molécules aromatiques possédant le coefficient antibactérien le plus élevé sont les phénols, ensuite viennent les aldéhydes, les cétones ;
- **Pouvoir antiviral** : les virus responsables de certaines pathologies comme le zona, l'herpès, la grippe, le sida sont traités avec succès par certaines huiles essentielles alors qu'à ce jour la médecine chimique se trouve désarmée. Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques et certaines pathologies virales graves se trouvent très nettement améliorées grâce à elles ;
- **Pouvoir antifongique** : ce sont des huiles essentielles pour s'opposer au développement des champignons, des moisissures en les détruisant ;

- **Pouvoir antiseptique** : s'opposent au développement des germes microbiens et les détruisent. La plupart des huiles essentielles ont ce pouvoir ;
- **Antiparasitaire** : s'opposent au développement et détruisant les parasites. Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites, et les cétones et lactones possèdent aussi une certaine toxicité ;
- **Pouvoir antibiotique** : particulièrement par modification du terrain ;
- **Insectifuge et insecticide** : huile essentielle qui peut être appliquée en cas de piqûres d'insectes ;
- **Pouvoir de cicatrisation et anti-brûlure**(Chemet et Fernandez, 2012).

Chapitre III:
Activité
antibactérienne

III.1. Généralités sur les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (*Bacteria*) et bactéries primitives (*Archaea*). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux *Bacteria* (Bousseboua, 2002).

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm et sont observables au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique (Nauciel et Vildé, 2005).

III.2. Culture des bactéries

La culture des bactéries nécessite habituellement des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40 °C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie peut se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie. Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe. L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (Nauciel et Vildé, 2005).

III.3. Les antibiotiques

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes, le plus souvent des champignons. Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) (Elghozi et Duval, 1992).

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Celle-ci est la plus fréquemment rencontrée.

Les principales familles chimiques des antibiotiques sont: Bêtalactamines (pénicilline et céphalosporines); Aminosides (streptomycine, gentamycine); Chloramphénicol et Thiamphénicol ; Cyclines (tétracyclines, doxycycline) ; Macrolides et apparentés : érythromycine, oléandomycine (Cohen et Jacquot, 2001).

III.4. Modes d'action des antibactériens

Le mécanisme par lequel les antibactériens agissent, a été bien établi, et a permis de les classer suivant leurs sites d'action (Figure 8) :

- Certains inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- D'autres altèrent la membrane cytoplasmique, provoquant des troubles du taux de perméabilité.
- Certains inhibent la synthèse des acides nucléiques.
- Beaucoup perturbent la synthèse protéique au niveau du ribosome (Daroui-mokaddem, 2012).

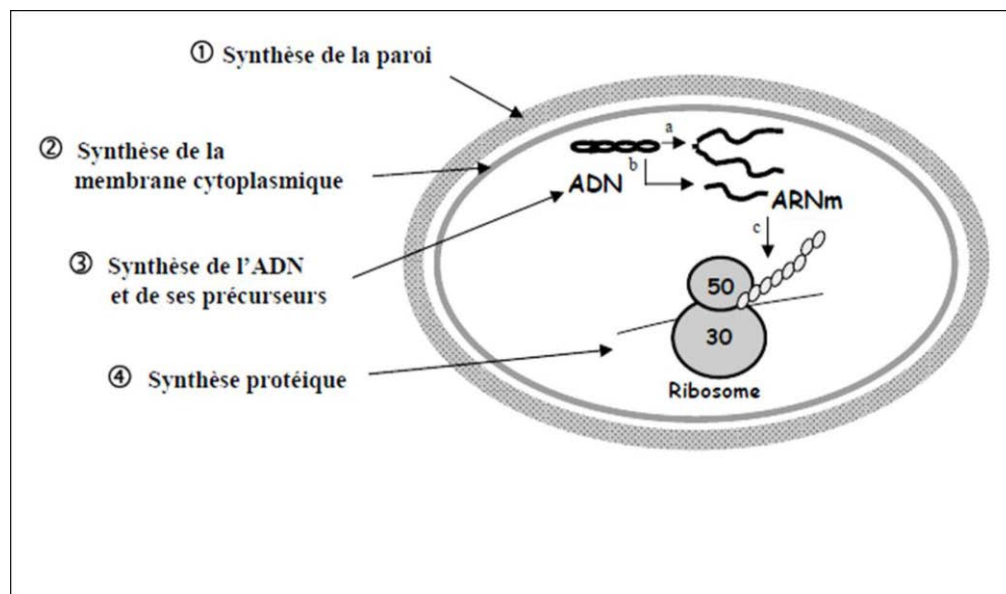


Figure 8 : Mode d'action des antibiotiques (a : réplication de l'ADN, b : transcription de l'ADN, c : traduction de l'ARNm) (Daroui-mokaddem, 2012).

III.5. Activité antibactérienne des extraits des plantes

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveau agents antibactériens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) (García-Ruiz *et al.*, 2008 ; Kempf et Zeitouni, 2009).

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antibactérienne des extraits de plantes médicinales tels que le fenouil (*Foeniculum vulgare*), peppermint (*Mentha piperita*), le thyme (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (Jürgen *et al.*, 2009).

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifiés les métabolites responsables de l'activité antibactérienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (Huang *et al.*, 2008).

III.6. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que des composées phénoliques. Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion des différents métabolites secondaires et selon la nature du contact de ces métabolites avec le germe (Fernandez et Chemat, 2012).

La majorité de chercheurs ont employé une des analyses suivantes : diffusion sur disque (aromatogramme), diffusion en puits, la méthode de dilution ou la méthode de micro-atmosphère (Burt, 2004). Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients (Wilkinson, 2006).

III.6.1. Méthode de l'aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable (10 à 25 mL), déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman (6 à 8 mm), préalablement imprégnés de quantités connues des différents substances à tester (5 à 30 μ L), sont alors placés en surface de la gélose (Wilkinson, 2006 ; Kechkar, 2008).

Après incubation, les germes se développent sous forme de colonies visibles à l'œil nu. L'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition du développement bactérien. 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. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de la substance à tester sur le germe. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre incluant le diamètre du disque, soit en traduisant en croix le degré d'activité (Guerin et Carret, 1999). Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition (Wilkinson, 2006).

III.6.2. Méthode de diffusion en puits

Méthode proposée par Cooper et Woodman en 1946 et reprise par Shroeder et Messing en 1949. Elle assure une diffusion radiale de la substance à tester à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de concentration connue de la substance à tester. Cette substance diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003; Fernandez et Chemat, 2012).

III.6.3. Méthode de dilution sur milieu liquide

Il s'agit de la méthode en bouillon de culture dans une série de tubes à essai, appelée méthodes des dilutions, dont but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrices (CMI), qui consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antibactérien nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Derwich *et al.*, 2010 ; Oussou *et al.*, 2008).

Les substances à tester peuvent être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Hellal, 2011).

III.6.4. Méthode de micro-atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans des boîtes de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné de la substance à tester qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation de la substance à tester sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé ensuite cette substance s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (Pibiri, 2005 ; Fernandez et Chemat, 2012).

III.7. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

La détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide d'une substance est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur le milieu de culture.

- S'il y a croissance bactérienne, la substance a un effet bactériostatique sur la souche testée.

- S'il au contraire il y a absence de croissance bactérienne, cette substance présente un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche

L'efficacité de l'huile essentielle et des différents extraits testés est évaluée par la mesure de 2 concentrations : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) (Derwich *et al.*, 2010 ; Oussou *et al.*, 2008).

III.8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMI est définies comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. Elle n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur (Mann et Markham, 1998). Elle est déterminée par l'utilisation d'une gamme de dilution de l'agent antibactérien, additionnée à une série de tubes d'un milieu de culture liquide, de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées et incubation dans les mêmes conditions, la CMI est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée. C'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble ne sont observés dans le milieu (Derwich *et al.*, 2010 ; Oussou *et al.*, 2008).

La CMB correspond à la concentration de l'agent inhibiteur nécessaire à laquelle l'action bactéricide est totale. Elle est définie comme étant la plus faible concentration à laquelle aucune croissance n'est observée après repiquage en bouillon frais. C'est la concentration capable d'engendrer 99,9 % de mortalité des cellules microbiennes initiales (Haddouchi *et al.*, 1999).

La CMB est déterminée en milieu liquide ou en milieu solide par l'évaluation des survivants après l'élimination du composé inhibiteur. Le test de la CMB succède directement au test de la CMI. Les cultures en présence de concentrations en inhibiteur n'ayant pas donné de développement, elles sont à nouveauensemencées sur milieu de culture neuf (liquide ou solide), puis incubées à la température optimale du germe considéré pendant 24 à 48heures (Fernandez et Chemat, 2012).

Deuxième partie :

Etude

expérimentale

Etude expérimentale

Chapitre I :

Matériel et

Méthodes

Le travail expérimental a pour objet l'étude de l'activité antibactérienne d'une plante médicinale à savoir, *Pinus halepensis* Mill. La partie expérimentale est réalisée au laboratoire de microbiologie, de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Abbés Laghrour, Khenchela.

I.1 Matériel

I.1.1. Matériel biologique

I.1.1.1. Matériel végétal

L'étude est menée sur les aiguilles de la plante *Pinus halpensis* Mill. dont les aiguilles ont été récoltées au mois de Mars, dans la région d'Ain Mimoun, Wilaya de Khenchela, caractérisée par un climat subaride. L'échantillonnage s'est effectué au hasard et a concerné des aiguilles portées par des rameaux inférieurs de cinq arbres en floraison.

La récolte a été réalisée tôt le matin car les vertus thérapeutiques des plantes y sont le plus concentrées (Sadou *et al.*, 2015).

I.1.1.2. Souches bactériennes testées

Afin de tester le potentiel antibactérien de l'huile essentielle et des extraits de *Pinus halepensis* Mill. *in vitro*, huit souches bactériennes sont utilisées, deux Gram positif :

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ;
- *Listeria monocytogenese* (ATCC 25922) ;

Et six Gram négatif :

- *Acenetobacter baumannii* (ATCC19606) ;
- *Escherichia coli* (ATCC 25922) ;
- *Klebsiella oxytoca* (ATCC 25922) ;
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ;
- *Salmonella sp* ;
- *Proteus mirabilis*.

Ces souches sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme et sont des souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC), sauf *Proteus mirabilis* qui provienne de l'hôpital d'Ali Boushaba-khenchela.

I.1.2. Matériel de laboratoire

I.1.2.1. Milieux de culture

- Bouillon nutritif pour la revivification des souches bactériennes ;
- Gélose nutritive (GN) pour le repiquage des souches bactériennes ;
- Bouillon Mueller Hinton pour la détermination de la CMI et la CMB ;
- Gélose Mueller Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries vis-à-vis les métabolites secondaires extraits (Annexe 1).

I.1.2.2. Produits chimiques

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits : DMSO (diméthyle sulfoxyde), eau physiologique, eau distillée, Solution de Mc.Farland, Acide chlorhydrique (HCL), réactif de Wagner, trichlorure de fer (FeCl_3), trichlorure d'aluminium (AlCl_3), éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, méthanol.

I.1.2.3. Appareillage utilisé

Parmi l'appareillage utilisé : Rota vapeur (HAHNVAPOR), bain Marie (MEMMERT), agitateur magnétique, autoclave (VAPOUR-Line), balance électrique (KERN PCB), balance à précision (KERN), étuve et four Pasteur (memmert), plaque chauffante (Hotplate Stirrer), vortex (VELP), réfrigérateur et congélateur (LIEBHERR), Soxhlet (Gerhardf) et Clevenger.

I.1.2.4. Outils et consommables

Boîtes de Pétri, tubes à essai, micropipettes, pipettes graduée, pipettes Pasteur, pipeteurs, disques de papier Wattman N°3 (6mm de diamètre), baro magnétique, écouvillons stériles, microplaques.

I.2. Méthodes

I.2.1. Méthodes d'extraction

But : cette étape a pour but d'extraire la quasi-totalité des métabolites secondaires de l'espèce notamment les composées phénoliques et les huiles essentielles.

I.2.1.1. Extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation

A. Principe

L'huile essentielle de *Pinus halepensis* a été extraite par une hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger qui consiste à immerger le matériel végétal dans un ballon contenant de l'eau distillée (après l'avoir coupé en parties très fines) et soumises à l'hydrodistillation en se servant du

dispositif d'extraction (Figure 9). L'hydrodistillation est basée sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les HE. Une extraction de l'huile essentielle à l'échelle de laboratoire a été effectuée principalement sur la partie aérienne de la plante représentée par ses aiguilles partiellement broyées (Penchev, 2010).

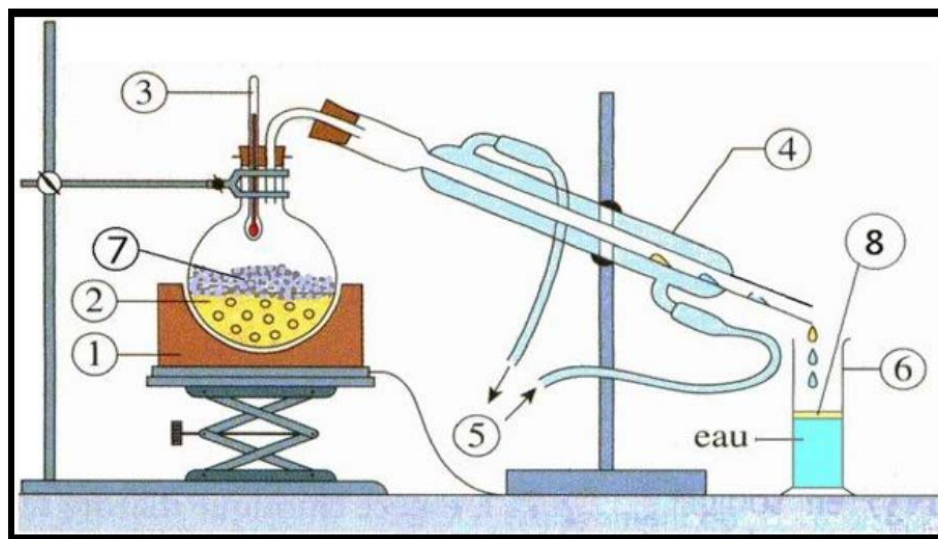


Figure 9 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).

1 : Chauffe ballon ; 2 : Ballon ; 3 : Thermomètre ; 4 : Réfrigérant ; 5 : Entrée et sortie d'eau ;
6 : Erlenmeyer ; 7 : Matière à extraire l'essence ; 8 : La couche d'H.E

B. Procédé d'extraction

Une masse de 115 g des aiguilles de la plante fraîche a été immergée dans un ballon bicol en verre pyrex d'un litre, contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir complètement le ballon (le contenu du ballon ne doit pas dépasser les deux tiers), l'ensemble est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon pendant 5 heures, ainsi l'eau bouillante pénètre dans les tissus de la plante, éclate les cellules, libère leurs huiles volatils et les entraîne avec elle, ensuite les vapeurs chargées de l'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis à travers le réfrigérant où aura lieu la condensation.

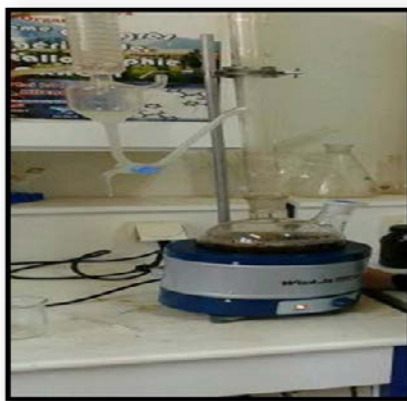


Figure 10 : Dispositif d'extraction Clevenger

C. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de matière végétale utilisée. Après récupération de l'huile essentielle, le rendement est calculé par la relation suivante :

$$R_{dt} (\%) = m/m_0 \times 100$$

R_{dt} : rendement d'huile essentielle (en pourcentage).

m : masse d'huile essentielle récupéré (g).

m_0 : prise d'essai de matériel végétale (g) (Afnor, 2000).

I.2.1.2.Extraction des métabolites secondaires par Soxhlet

A. Principe

L'extracteur de Soxhlet est un appareil utilisé en chimie analytique qui permet de faire à chaud l'extraction par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Cet appareil porte le nom de son inventeur : Franz Von Soxhlet (Charles, 2008).

Le Soxhlet est constitué d'un ballon contenant une réserve de solvant, un extracteur proprement dit permettant le contact entre le solvant et le solide dans une cartouche poreuse, un siphon qui permet l'évacuation de la solution vers le ballon et un réfrigérant à eau permettant la condensation des vapeurs de solvant dans la cartouche (Figure 11).

Le solide est toujours en contact avec le solvant pur grâce au remplissage régulier de la cartouche, ce qui présente les meilleures capacités de solubilisation des composés à extraire (Herzi, 2013). Un schéma illustrant le montage de Soxhlet est dans la figure 11.

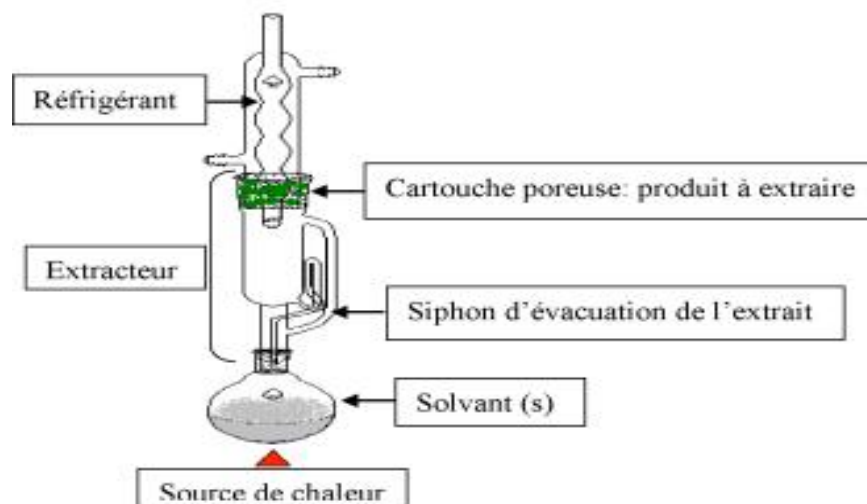


Figure 11 : Schéma illustrant le montage de Soxhlet (Herzi, 2013).

B. Mode opératoire

L'extracteur de Soxhlet permet le traitement des solides (matière végétale) avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps en verre de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matière végétale (105 g). Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmontée d'un réfrigérant (Quan *et al.*, 2004). Le ballon contenant le solvant d'extraction est chauffé, et le solvant ainsi est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec la matière végétale. Le solvant collecté dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et la matière végétale est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction continue jusqu'à épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche (Sarker *et al.*, 2006).

Les extractions au Soxhlet ont été effectuées de façon séquentielle, en utilisant des solvants de polarité croissante : l'éther de pétrole (pour éliminer les pigments et la chlorophylle), le chloroforme (de polarité faible, utilisé pour l'extraction des composés apolaire), l'acétate d'éthyle (de polarité moyenne, utilisé pour l'extraction des aglycones flavonoïdiques et les monosides) et enfin le méthanol (le plus polaire). Cette approche d'extraction permet de fractionner grossièrement les divers produits naturels de la matrice végétale (William, 2007).

En premier lieu, verser 700 ml d'éther de pétrole dans le ballon et porter à ébullition. Après plusieurs siphonages, le solvant s'enrichi en substances solubles (Figure 12).



Figure 12 : montage expérimental d'extraction Soxhlet

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des fractions. L'extraction est arrêtée lorsque le liquide entourant la cartouche devient clair, cette couleur indique que le solvant n'extrait plus rien du solide et le cycle reprend pour les autres solvants. Le temps de traitement est différent selon le solvant, souvent plus de 30 heures. Le contenu du ballon (solvant plus matières solubilisées) est ensuite traité à l'aide du Rotavapor pour éliminer le solvant et le résidu est pesé pour quantifier la masse d'extrait total sec (Pibiri, 2005). Le montage expérimental est illustré dans la figure 12.

I.2.2. Screening phytochimique

But : les tests phytochimiques ont été réalisés sur les extraits, pour but la mise en évidence des différents métabolites secondaires : les saponines, les alcaloïdes, les tanins et les flavonoïdes.

I.2.2.1 Mise en évidence des saponosides (saponines)

5 ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides (Karumi et al., 2004).

I.2.2.2. Mise en évidence des alcaloïdes

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. A l'extrait sec, ajouter 5 ml d'HCl (2N) au résidu et chauffer au bain marie à 45 °C pendant 4 minutes. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Wagner. La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels (Benmahdi, 2001).

I.2.2.3. Mise en évidence des tanins

A 2 ml de la solution à tester, ajouter 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 2 %. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire indique la présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (Karumi *et al.*, 2004).

I.2.2.4. Mise en évidence des flavonoïdes

5 ml d'extrait sont traités avec quelques gouttes d' AlCl_3 à 1 %. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune (Edeaga *et al.*, 2005).

I.2.3. Etude de l'activité antibactérienne

Ce test est réalisé *in vitro*, la technique utilisée est la technique de contact direct qui compte deux méthodes, la méthode des puits et celle de diffusion, nous avons adopté la dernière, dite l'aromatogramme. Cette méthode est appelée aromatoigramme par référence à l'antibiogramme, la seule différence est que l'antibiotique est remplacé par la substance à tester (Benjelali *et al.*, 1986).

I.2.3.1. Principe

La méthode de diffusion sur gélose consiste à déposer, sur une culture de germes indicateurs préalablement ensemencés, des disques imbibés d'extrait. La diffusion de l'extrait sur le milieu peut inhiber la croissance des souches à tester. Pour les bactéries, une zone claire ou zone d'inhibition est observée lorsque l'extrait est actif, la mesure du diamètre du halo d'inhibition permet d'évaluer la sensibilité de ces germes qui peut varier en fonction de la souche testée (Ferron, 1994; Soussy, 1990).

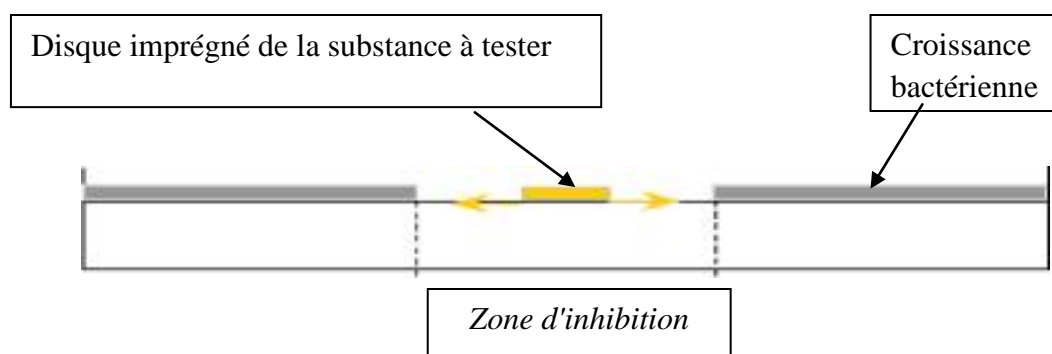


Figure 13 : principe de l'aromatogramme

I.2.3.2. Mode opératoire

A. Préparation des disques

Cette préparation se fait à l'aide du papier Wattman N° 03, qui est découpé en disques de 06 mm de diamètre, qui seront placés dans une boîte en verre à vis pour la stérilisation à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C (Ferron, 1994).

B. Préparation de pré-culture

- **Revivification des souches** : chaque souche bactérienne est revivifiée dans 9ml de bouillon nutritif puis incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures. La turbidité du bouillon nutritif indique le développement de souches cultivées (Benjelali *et al.*, 1986).
- **Repiquage des souches** : à partir des cultures préparées précédemment, les souches sont repiquées. Pour chaque souche, une ansée de cette culture estensemencée en stries sur une boîte de Pétri contenant la gélose nutritif solide. Les cultures sont incubées dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées (Bousseboua, 2002).

C. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure sur milieu gélosé des bactéries à tester (ayant au maximum 24 heures), racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %. Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mack Ferland (Annexe 1) (DO=0,08-0,10 lue à 625 nm) (Bousseboua, 2002).

D. Ensemencement

Le milieu de culture utilisé est Muller-Hinton (Annexe 1), qui est le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Couler la gélose Muller-Hinton dans chaque boîte de Pétri (4 mm d'épaisseur), et laisser solidifier. Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétri 60 ° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (Wilkinson, 2006).

E. Dépôt des disques

Des disques stériles de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 10 µl d'extrait à l'aide d'une micropipette à cône stérile, à une concentration de 100 mg/ml pour chaque extrait, et à différentes dilutions dans le cas de l'huile essentielle, à la surface du milieu gélosé, Mueller-Hinton, en boîte de Pétri préalablement ensemencées par écouvillon en stries à raison de 4 disques par boîte. Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

Des disques imprégnés par 10 µl de chaque solvant d'extraction stérile (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol) sont préparés et déposés dans les boîtes de Pétri déjà ensemencées. Ces dernières catégories de disques serviront de contrôle négatif ou témoin.

Un disque imprégné par 10 µl de DMSO a été utilisé comme témoin négatif dans le cas de l'huile essentielle (Fernandez et Chemat, 2012).

F. Incubation et lecture

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle graduée millimétrée autour des disques après une pré-incubation de 30 minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures. Les expériences sont réalisées en trois répétitions pour chaque extrait (Ponce *et al.*, 2003).

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis les différents extraits est classés selon le diamètre d'inhibition d'après les critères suivants:

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm ;
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm ;
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm. ;
- Extrêmement sensible (+++) diamètre > 20 mm (Ponce *et al.*, 2003).

I.2.4. Détermination des Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI est définies comme étant la plus basse concentration de l'agent antibactérien capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. Elle n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur. Elle est déterminée par la méthode de micro-dilution par l'utilisation d'une gamme de dilution de l'agent antibactérien (Mann et Markham, 1998).

La concentration de la solution mère de chaque extrait est égale à 100mg/ml, on procède à des dilutions successives par progression d'une suite géométrique : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, et 1/256.

Dans chaque puits de microplaque, nous avons introduit :

- 90 μ L de bouillon Mueller- Hinton ;
- 10 μ L de l'inoculum (10^5 UFC/ml) ;
- 100 μ L de chaque extrait est ensuite ajouté dans chaque puits de la microplaque (Figure 14) ;
- Les microplaques sont scellées et placées dans un incubateur à 37 °C pendant 24 heures.

Après incubation, les CMI sont déterminées à l'œil nu, en examinant la croissance bactérienne, dans chaque puits, qui se traduit par une turbidité (Coyle, 2005).

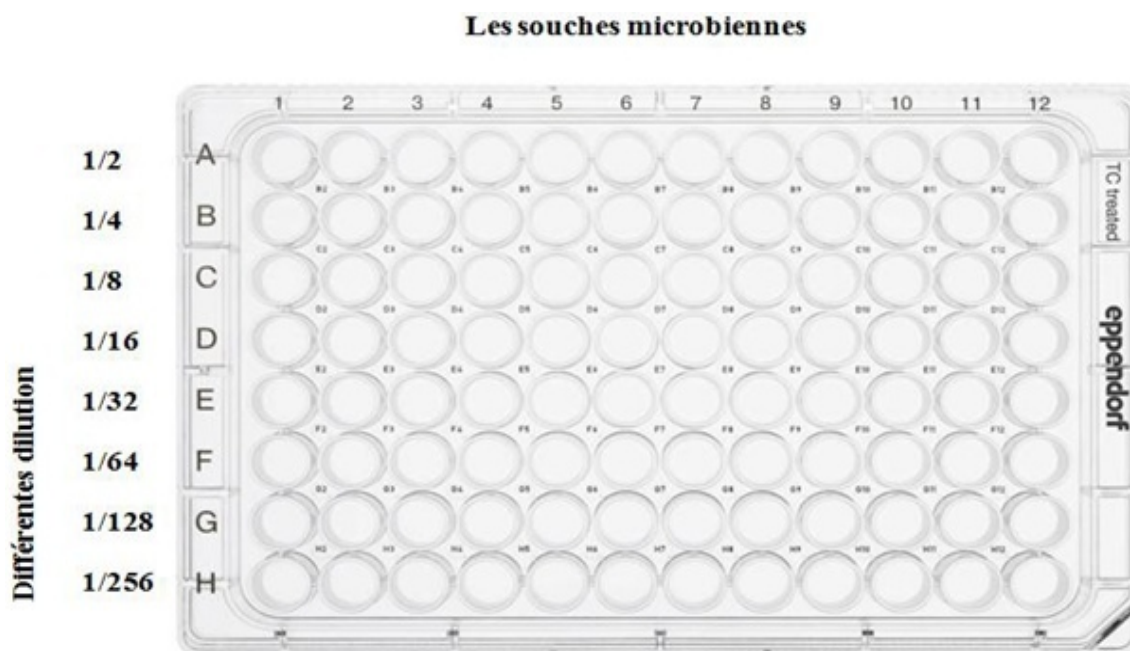


Figure 14 : La méthode de microdilution (microplaque)

I.2.5. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La CMB testée a été déterminée comme étant la plus faible concentration à laquelle aucune croissance visible du micro-organisme n'avait eu lieu. Pour estimer l'activité létale de l'huile essentielle ainsi que des différents extraits, les microorganismes sont transférés du bouillon liquide où aucune croissance n'a été observée (sur microplaque), et incubés dans des tubes à essai qui contient 9 ml d'un nouveau milieu de bouillon MH pendant 24 heures à 37 °C (Figure 15).

La plus faible concentration entraînant l'inhibition de la croissance totale est reconnue comme la concentration minimale mortelle, CMB pour les bactéries (concentration minimale bactéricide). (Fernandez et Chemat, 2012).



Figure 15 : Détermination de la CMB.

I.2.6. L'analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple et les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type.

Chapitre II :

Résultats et

Discussion

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la partie aérienne (les aiguilles) de la plante médicinale *Pinushalepensis* Mill.

II.1. Rendements des extraits

La préparation des extraits à partir des aiguilles de *Pinushalepensis* Mill. a été effectuée par des solvants à polarité croissante, il s'agit de l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol.

L'extraction par Soxhlet a permis d'obtenir quatre extraits bruts:

- l'extrait d'éther de pétrole (EtP) ;
- l'extrait chloroformique (Chl) ;
- l'extrait d'acétate d'éthyle (AcEt) ;
- l'extrait méthanolique (MeOH).

Les rendements sont exprimés en pourcentage de la masse d'extrait par rapport à la masse des aiguilles fraîches (Figure 16).

L'extraction de l'huile essentielle (HE) est effectuée par l'hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Les extraits obtenus sont de couleurs et d'aspects différents (tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des différents extraits.

Extrait	Couleur	Aspect
HE	Incolore à jaune pâle	Liquide limpide
Etp	Vert clair	gel
Chl	Vert noir	pâte
AcEt	Vert foncé	visqueux
MeOH	Vert foncé	visqueux

Les résultats montrent que le rendement le plus élevé est observé avec l'extrait MeOH avec 20,41% suivi par l'extrait Chl avec 10,12 %, puis l'extrait AcEt avec 5,26 %, et enfin l'extrait EtP qui possède le rendement le plus faible à savoir 1,44 %.

Il est important de souligner que la méthode utilisée dans le choix des solvants, ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (Soxhlet), affectent tous le contenu total en métabolites secondaires, et par conséquent affectent l'activité antibactérienne médiée par ces métabolites (Lee *et al.*, 2003).

Le rendement en huile essentielle de *Pinushalepensis* Mill. a fourni un taux de 0,96%. Cependant, ce taux est relativement élevé comparé à ceux rapportés par (Sadouet *al.*, 2015) qui est de 0,81%. Nous notons aussi que le rendement de l'huile essentielle de la même espèce récoltée dans la région de Sidi Fredj en Algérie, est de 0,52% (Dobet *al.*, 2005). Cette variation est probablement due à la sensibilité de l'huile essentielle aux facteurs biotiques et abiotiques.

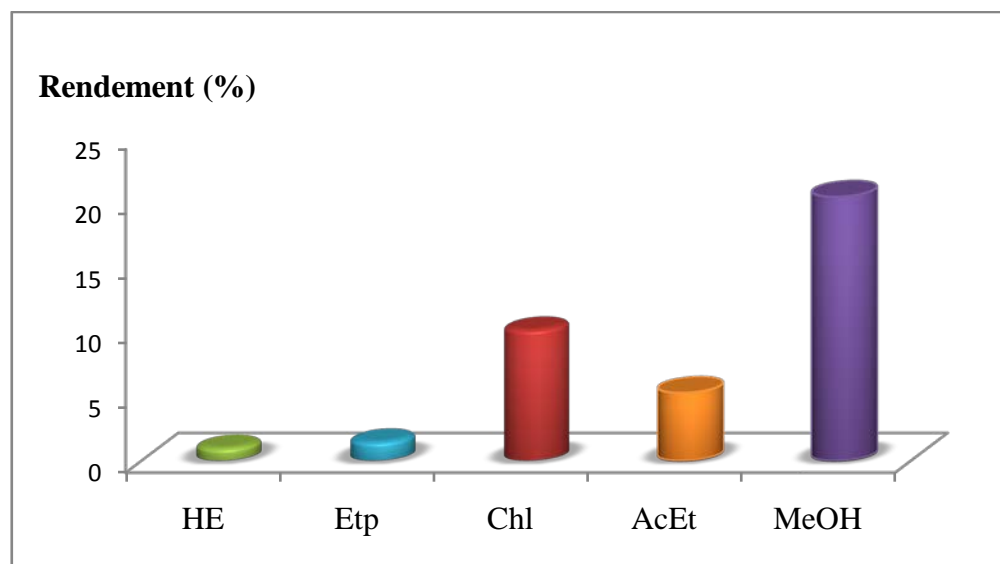


Figure16 : Rendement d'extraction des différents extraits.

II.2. Test de Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les feuilles de *Pinushalepensis* épuisés par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol sont présentés dans le tableau 3 et la figure17.

Tableau 3: Résultats des tests phytochimiques sur les feuilles de *Pinushalepensis* Mill.

Les extraits	Saponines	Alcaloïdes	Tanins	Flavonoïdes
Etp	L'apparition d'une faible mousse (+)	(-)	(-)	(-)
Chl	apparition d'une mousse (plus de 1 cm) (+++)	(-)	Couleur brun verdâtre (+++) Présence des tanins catéchiques	(-)
AcEt	apparition d'une faible mousse (+)	(-)	Couleur bleu noir (+++) Présence des tanins galliques	Couleur jaune (+++)
MoH	apparition d'une faible mousse (+)	Résultat positif avec le réactif de Wagner (présence de turbidité) (+)	Couleur bleu noir (+++) présence des tanins galliques	Couleur jaune (++)

(-) : Test négatif, (+) : Test faiblement positif, (++) : moyennement positif ; (+++) : Test fortement positif.

L'analyse phytochimique réalisée a permis de constater la présence des quatre grands groupes chimiques : les tanins, les flavonoïdes, les saponines et les alcaloïdes dans l'extrait MeOH alors que l'extrait EtP ne contient que les saponines.

Dans l'extrait Chl, la recherche des saponines et des tanins s'est montrée positive mais celle de flavonoïdes et des alcaloïdes a été négative.

Il est à signaler que l'extrait AcEt contient les saponines, les flavonoïdes et les tanins mais ne contient pas des alcaloïdes.

Saadou, en (2008), confirme que très peu des références bibliographiques et de travaux scientifiques sont réalisés dans le sujet de la composition chimique de l'espèce *Pinushalepensis* Mill. Cependant, il a rapporté la présence des mêmes classes de familles chimiques retrouvées au niveau des feuilles de cette plante.

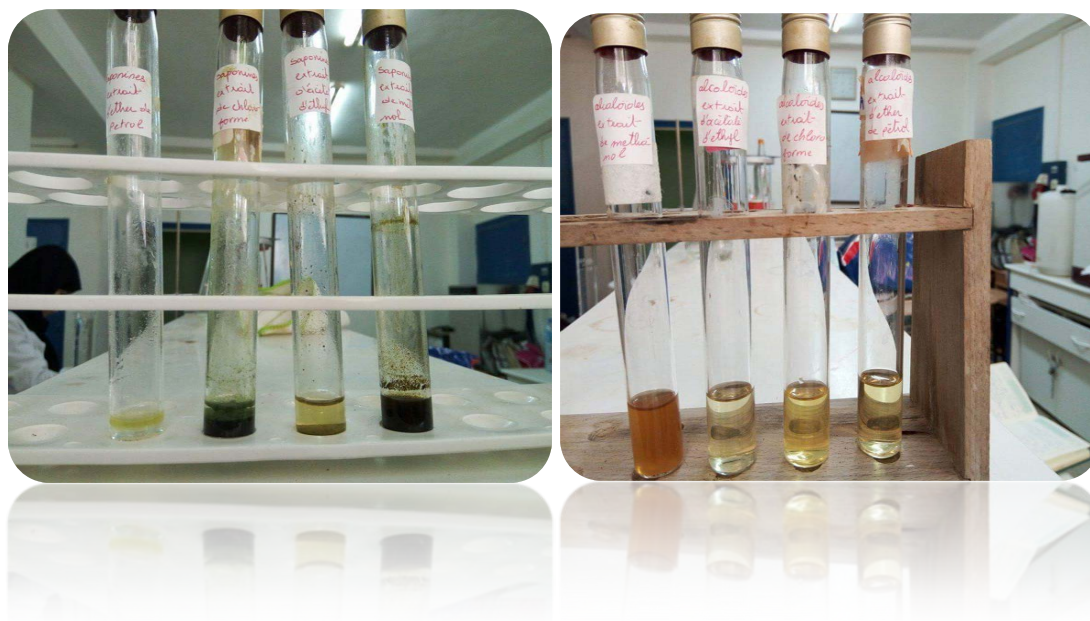


Figure17 : Résultats de screening phytochimique.

II.3. Test de l'activité antibactérienne

La méthode de disque ou l'aromatogramme a permis de déterminer l'action des huiles essentielles ainsi que des extraits de la plante *in vitro* sur les différentes souches testées, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

II.3.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est effectuée par la méthode de diffusion en milieu solide ou la méthode des disques. Les tests ont été réalisés d'une part à partir des huiles essentielles brutes et d'autre part par une série de dilutions au $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$ dans le DMSO.

La culture des souches étudiées en présence des différents disques des huiles essentielles testés a enregistré des zones d'inhibitions avec des valeurs remarquables pour les huiles essentielles brutes qui varie de 8 à 25 mm et la zone la plus élevée est observée chez *Staphylococcus aureus* alors que pour les huiles essentielles diluées à la $\frac{1}{2}$ a montré une activité un peu faible avec des diamètres compris entre 7 et 20 mm ; la zone la plus élevée est observée chez *Staphylococcus aureus*. Cependant les huiles essentielles diluées au $\frac{1}{4}$ présentent des zones d'inhibition moins faibles variant de 6 à 16 mm (tableau 4).

Tableau 4 : Diamètre des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *Pinushalepensis*.

Les souches	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)		
	HE	1 /2	1/4
<i>Escherichia coli</i>	8	7	6
<i>Salmonella sp</i>	9	8	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	20	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	7	7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	13	11	10
<i>Listeria monocytogenese</i>	22	18	15
<i>Acinetobacter baumannii</i>	13	12	9
<i>Proteus mirabilis</i>	9	8	7

Il ressort des résultats obtenus que les zones d'inhibition soient diminuées avec les dilutions de l'huile ; nous avons alors constaté que la plupart des souches testées sont sensibles aux huiles essentielles des feuilles de *Pinushalepensis* Mill., notamment *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenese*, bactéries Gram positif, sont les plus sensibles avec des diamètres des zones d'inhibition de 25 et 22 mm respectivement. Par contre *E. coli*, *salmonella sp* et *Proteus mirabilis*, bactéries Gram négatif, sont les souches les plus résistantes aux huiles essentielles de cette plante (Figure 18).

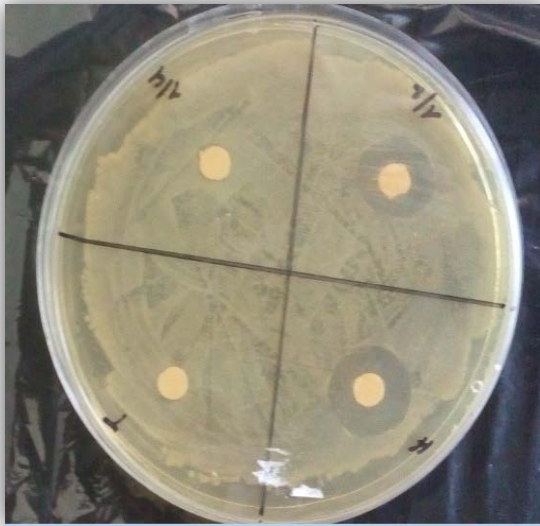
Plusieurs travaux (Xianfei et al., 2007 ; Sandriet et al., 2007 et Zarai et al., 2011) ont rapporté que les bactéries Gram positif sont plus susceptibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram négatif. La résistance élevée des bactéries Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à son revêtement lipopolysaccharide.

L'absence de cette barrière, chez les bactéries Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique (Sandriet et al., 2007 ; Zarai et al., 2011). Nos résultats sont en accord avec ceux d'Abi Ayad et al., (2011), qui ont observé une sensibilité plus importante chez *Staphylococcus aureus* que chez *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des huiles essentielles de *Pinushalepensis* Mill.

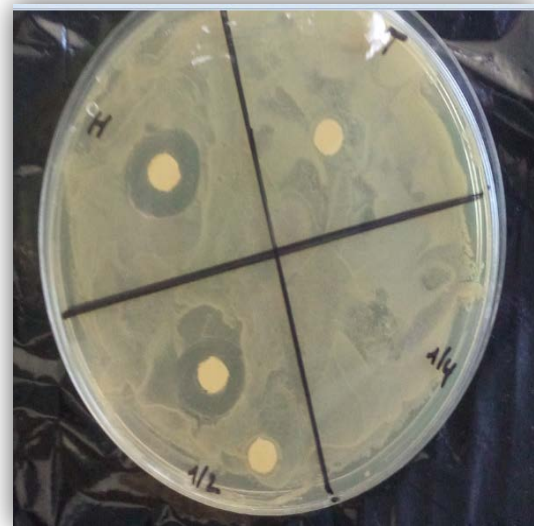
Les propriétés antibactériennes des HE de plusieurs plantes aromatiques et médicinales sont attribuées à leur composition chimique et surtout aux alcools terpéniques.

En outre, le fort pouvoir inhibiteur des HE est due essentiellement à ses principaux constituants (Randrianarivelo et al., 2009 ; Al-Bayati, 2008).

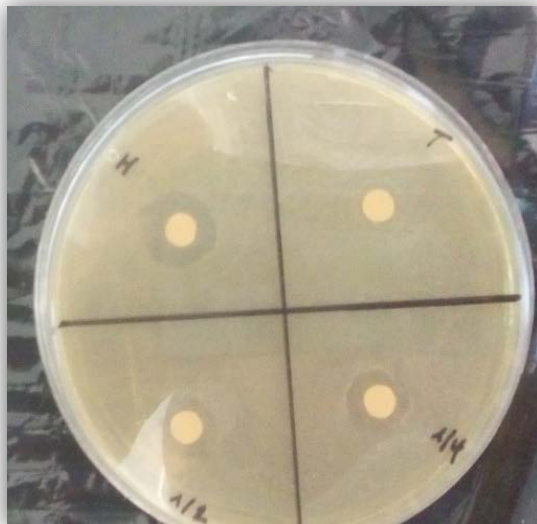
Bien que l'action principale des huiles essentielles comme antibactérien semble être centrée dans leur activité sur la membrane cellulaire, d'autres mécanismes d'action peuvent intervenir tels que la dénaturation des protéines, inactivation des enzymes et elles peuvent interagir avec les acides nucléiques (Bouzidi, 2016).



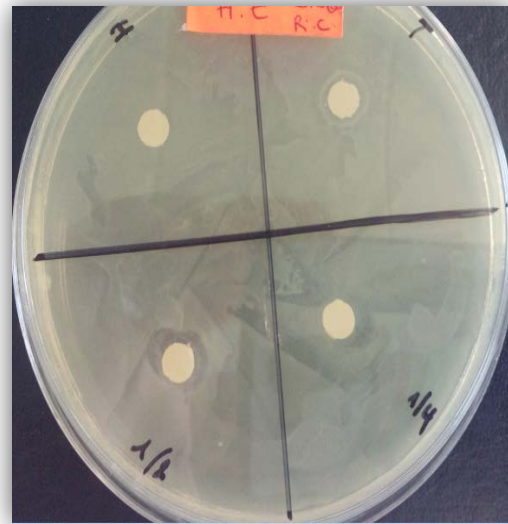
Staphylococcus aureus



Listeria monocytogenes



Klebsiella oxytoca



II.3.2. Activité antibactérienne des extraits de *Pinushalepensis* Mill.

Les extraits aux solvants éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol de *Pinushalepensis* Mill. sont testés contre une série de microorganismes et les résultats montrent clairement l'effet antibactérien sur toutes ces souches, mais avec des diamètres d'inhibition différents (tableau 5).

Tableau 5 : Diamètre des zones d'inhibition des quatre extraits de *Pinushalepensis*.

les extraits les souches	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	EtP	Chl	AcEt	MeOH
<i>Escherichia coli</i>	7±0,5	21,66±0,57	24±1	26,33±0,57
<i>Salmonella sp</i>	7,33±0,57	20±0	21±0	23,66±0,28
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,33±0	8,5±0,28	8,66±0	9±0,28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,5±0,5	7±0	7,5±0,57	8±0,57
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9±1	12,33±0,57	13,66±0,28	15±1
<i>Listeria monocytogenese</i>	9,5±0,5	10,33±0,28	10,66±0,76	11,33±0,57
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7,66±0,28	18,33±0,57	19,33±0,57	21±0
<i>Proteus mirabilis</i>	7,33±0,57	13±0	15,66±0,28	19±1

Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n= 3) avec ± l'écartype

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antibactérienne des extraits explique la diversité de leurs compositions chimiques.

Tous les extraits ont réagis positivement sur la majorité des souches bactériennes testées ce qui confirme que la plante *Pinushalepensis* est douée de propriétés antibactériennes.

Les résultats obtenus avec l'EtP montrent une faible activité antibactérienne sur *Listeria monocytogenese* et *Klebsiella oxytoca* et ne montre aucune activité sur les autres souches testées.

L'extrait Chl montre une forte activité sur *E.coli* avec un diamètre de 21,66 mm et la plus faible activité est enregistrée chez *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de 7 mm.

L'extrait AcEt présente une forte activité sur *E.coli et Salmonelle* avec des diamètres de 24 et 21mm respectivement et au contraire une faible activité sur *Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres de 8,66 et 7,5mm respectivement.

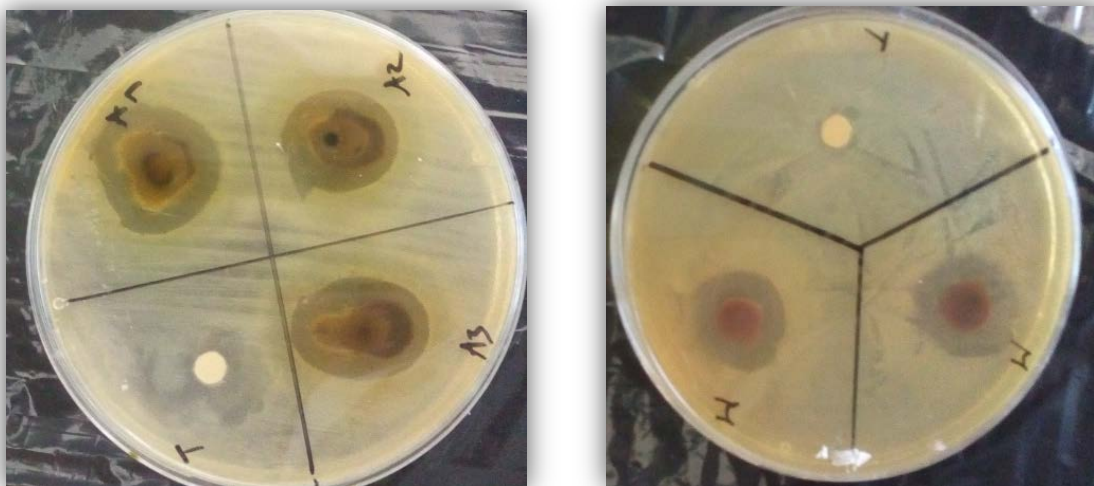
Pour l'extrait MeOH présente la plus forte activité sur toutes les souches testées par rapport aux autres extraits notamment sur *E.coli et Salmonelle* avec des diamètres de 26,33 et 23,66mm respectivement mais ne présente aucune activité sur *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 19).

Ces différences de sensibilité des microorganismes contre les extraits de *Pinus halepensis* Mill. peuvent être expliquées par la quantité et la qualité des molécules bioactives ou par la nature et la composition de la paroi cellulaire ainsi que la puissance du système enzymatique de la cellule qui contrôle son métabolisme (Ponce et al., 2003), ce qui a été confirmé avec l'extrait MeOH qui présente la plus forte activité sur toutes les souches testées qui pourrait être due à leur richesse en métabolites secondaires.

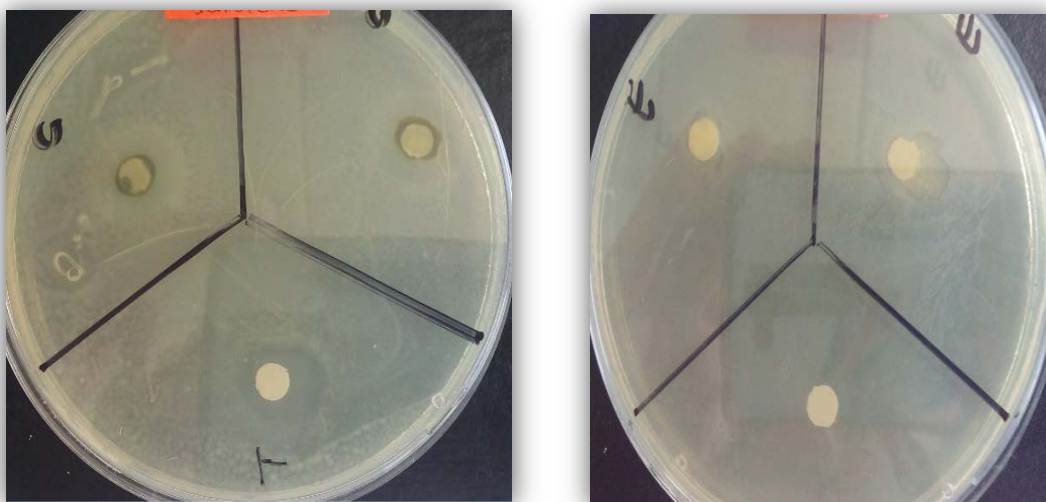
La plus faible sensibilité de *Staphylococcus aureus*, bactérie à Gram positive, vis-à-vis des extraits peut être expliquée par la structure de la paroi hétérogène de la bactérie : la présence de l'exopolysaccharide contenant une couche externe (glycocalyx), la présence de certains composants comme l'acide teichoïque et quelques liens entre les divers composants donnent au polymère fortement réticulé de parois cette résistance (Perry et al, 2004).

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis les quatre extraits de la plante peut être expliquée par la forte mobilité de cette bactérie, il est probable que cette bactérie se soit déplacée profondément dans la gélose, et par conséquent elle s'échappe ainsi à l'action des métabolites contenus dans les extraits (Beernesh et al., 1996).

Les activités antibactériennes plus ou moins importantes montrées par les divers extraits de la plante étudiée justifient l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle. Les résultats ont indiqués que plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antibactérienne tels que : le type de micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité, la concentration et le type de l'extrait, la nature et la structure des molécules bioactives. Des études plus approfondies *in vivo* seraient nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives une fois isolées ainsi que leur dose thérapeutique et leur site d'action au niveau de la cellule. Cela permettrait éventuellement de préparer des produits pharmaceutiques de grand intérêt thérapeutique (Hammoudi, 2015).



Escherichia coli (AcEt)*Salmonelle sp*(MeOH)



Staphylococcus aureus(Chl)*Pseudomonas aeruginosa*(EtP)

E :extraitEtp, C :extrait Chl, A :extrait AcEt, M :extrait MeOH, T :témoin.

Figure 19 : la sensibilité des bactéries testées contre les extraits de *Pinushalepensis*Mill.

II.4. Détermination des paramètres antibactériens (CMI et CMB)

Le test de diffusion en milieu solide n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des extraits végétaux, c'est aussi un test préliminaire pour un autre essaimicrobiologique complémentaire, qui est la dilution en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits pour déterminer la CMI.

Cette dernière est déterminée uniquement pour les souches qui ont montré une activité pour les différents extraits. Cette technique est réalisée pour une gamme de concentration des extraits allant de 50 à 0,39 mg/ml et dans le cas de l'huile essentielle pour une gamme de dilution de l'huile essentielle allant de 1/2 à 1/254.

Tous les extraits de *Pinushalepensis* Mill se sont révélés actifs envers la plupart des souches bactériennes testées mais avec des degrés différents ce qui s'est traduit par la différence des CMI.

Après la lecture des CMI, des repiquages à partir des puits des microplaques qui ne présentent aucune croissance visible, sont effectués dans des tubes contenant le bouillon Muller-Hinton pour déterminer la CMB.

II.4.1. L'extrait d'éther de pétrole (EtP)

Pour l'extrait d'EtP nous avons réalisé le test de CMI seulement pour les souches ayant une sensibilité à cet extrait. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 6.

Tableau 6 : CMI et CMB de l'extrait EtP.

Les souches	Concentrations d'EtP en (mg /ml)								CMB	CMB/ CMI	interprétation
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	- CMI	+	+	+	+	+	+	+	>50	>1	bactériostatique
<i>Listeria monocytogenese</i>	- CMI	+	+	+	+	+	+	+	>50	>1	bactériostatique

(+) : trouble (croissance) ; (-) : absence de croissance (inhibition), CMB/CMI=1 (Bactéricide) ; CMB/CMI > 1 (Bactériostatique).

A partir du tableau, on a pu conclure que la valeur de CMI de l'extrait d'éther de pétrole de *Pinushalepensis* Mill. est égal à 50 mg/ml pour les deux souches testées, et la CMB des deux souches est >50 mg/ml ce qui confirme que l'extrait EtP a un effet bactériostatique envers toutes les souches testées.

II.4.2. L'extrait chloroformique (Chl)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait chloroformique est effectuée sur six souches bactériennes parmi les huit testées, car *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ont manifestés une résistance envers cet extrait. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 7.

Tableau 7: CMI et CMB de l'extrait Chl.

Les souches	Concentrations de Chl en (mg/ml)								CMB	CMB/ CMI	Interprétation
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39			
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	+	50	8	bactériostatique
<i>Salmonella sp</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	25	2	bactériostatique
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	- CMI	+	+	+	+	+	+	25	1	bactéricide
<i>Listeria monocytogenese</i>	- CMI	+	+	+	+	+	+	+	>50	>1	bactériostatique
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	50	4	bactériostatique
<i>Proteus mirabilis</i>	-	- CMI	+	+	+	+	+	+	25	1	bactéricide

(+) : trouble (croissance) ; (-) : absence de croissance (inhibition), CMB/CMI=1 (Bactéricide) ; CMB/CMI > 1 (Bactériostatique).

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus, on constate que les valeurs des CMI de l'extrait chloroformique varient d'une souche à une autre et la valeur la plus élevée est enregistrée avec *Listeria monocytogenese* de l'ordre de 50 mg/ml ; par contre la plus faible est enregistrée avec *Escherichia coli* qui est de l'ordre de 6,25 mg/ml. D'après ces résultats, on pourrait conclure que l'extrait Chl exerce un effet bactériostatique sur la plupart des souches.

II.4.3. L'extrait d'AcEt

Les CMI de l'extrait AcEt ont été déterminées pour six souches seulement qui ont présenté une sensibilité envers cet extrait. Les résultats de détermination de la CMI et la CMB pour l'extrait AcEt sont cités dans le tableau ci-dessous (tableau 8).

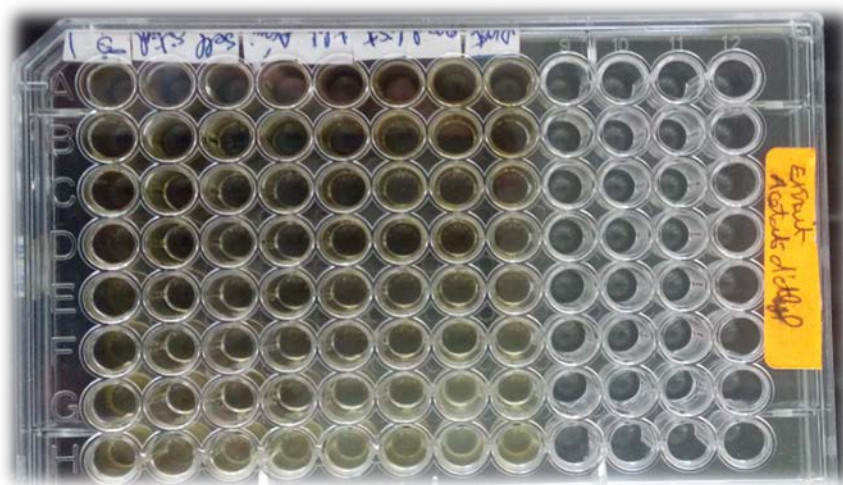
Tableau 8 :CMI et CMB de l'extraitAcEt.

Les souches	Concentrations d'AcEt en (mg/ml)								CMB	CMB/CMI	interprétation
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39			
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	- CMI	+	+	+	3,12	1	bactéricide
<i>Salmonella sp</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	+	12,5	2	bactériostatique
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	25	2	bactériostatique
<i>Listeria monocytogenese</i>	- CMI	+	+	+	+	+	+	+	50	1	bactéricide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	12,5	1	bactéricide
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	25	2	bactériostatique

(+) : trouble (croissance) ; (-) : absence de croissance (inhibition), CMB/CMI=1 (Bactéricide) ; CMB/CMI > 1 (Bactériostatique).

L'extrait AcEt a présenté une CMI de 12,5 mg/ml pour les souches *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii* et *Proteus mirabilis* et une CMI de 50 mg/ml pour *Listeria monocytogenese*, tandis que les souches *Escherichia coli* et *Salmonella sp* ont été inhibés à 3,12 et 6,25 mg/ml de l'extrait AcEt respectivement (figure 20).

L'extrait AcEt exerce d'une part un effet bactériostatique sur *Salmonella sp*, *Klebsiella oxytoca* et *Proteus mirabilis* et d'autre part un effet bactéricide sur *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenese* et *Acinetobacter baumannii*.

**Figure 20** : Concentration minimale inhibitrice d'AcEt.

II.4.4.L'extrait méthanolique (MeOH)

Pour l'extrait MeOH, les CMI et les CMB ont été déterminées pour les différentes souches bactériennes à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui ne montre aucune sensibilité pour cet extrait.

La souche *E. Coli* est la plus sensible à cet extrait avec une CMI de 1,56 mg/ml, suivie de *Salmonella sp.* avec une CMI de 3,12 mg/ml puis *Acinetobacter baumannii* et *Proteus mirabilis* avec une CMI de 6,25 mg/ml. Tandis que les deux souches *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* semblent plus résistantes avec une CMI de 50 mg/ml.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 9).

Tableau 9 : CMI et CMB de l'extrait MeOH

Les souches	Concentrations de MoH en (mg/ml)								CMB	CMB/ CMI	interprétation
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39			
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	- CMI	+	+	1,56	1	bactéricide
<i>Salmonella sp</i>	-	-	-	-	- CMI	+	+	+	3,12	1	bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	- CMI	+	+	+	+	+	+	+	50	1	bactéricide
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	- CMI	+	+	+	+	+	+	25	1	bactéricide
<i>Listeria monocytogenes</i>	- CMI	+	+	+	+	+	+	+	50	1	bactéricide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	+	50	8	bactériostatique
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	+	6,25	1	bactéricide

(+) : trouble (croissance) ; (-) : absence de croissance (inhibition), CMB/CMI=1 (Bactéricide) ; CMB/CMI > 1 (Bactériostatique).

D'après ces résultats des CMI et des CMB obtenus, on peut conclure que l'extrait méthanolique a un effet bactéricide sur la plus part des souches testées.

II.4.5. Les huiles essentielles (HE)

L'essai des dilutions en série dans les microplaques de 96 puits a révélé des valeurs de CMI. Les CMI et les CMB des huiles essentielles de *Pinnushalepensis* Mill. sur les huit souches bactériennes étudiées ont été alors déterminées et regroupées dans le tableau 10.

Tableau 10 :CMI et CMB del'huile essentielle(HE).

Les souches	Concentration en HE								CMB	CMB/ CMI	interprétation
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/254			
<i>Escherichia coli</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	1/4	2	bactériostatique
<i>Salmonella sp</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	1/4	2	bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	- CMI	+	1/128	1	bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	1/8	1	bactéricide
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	+	1/16	1	bactéricide
<i>Listeria monocytogene se</i>	-	-	-	-	-	- CMI	+	+	1/64	1	bactéricide
<i>Acenetobacter baumannii</i>	-	-	-	- CMI	+	+	+	+	1/16	1	bactéricide
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	1/4	2	bactériostatique

(+) : trouble (croissance) ; (-) : absence de croissance (inhibition),CMB/CMI=1(Bactéricide) ; CMB/CMI > 1 (Bactériostatique).

L'huile essentielle de *Pinushalepensis* Mill. a présenté une CMI de 1/8 pour les souches *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* et une CMI de 1/16 pour les souches *Klebsiella oxytoca* et *Acenetobacter baumannii*. Par contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogene se* ont été inhibé à 1/128 et 1/64 de l'huile essentielle respectivement.

La détermination des CMI et CMB a montré que celles-ci varie selon l'espèce, de plus on a montré que notre huile ayant un effet bactériostatique avec certaines souches et elle exerce un effet bactéricide avec d'autre espèces

Selon (Meena et Sethi, 1994) nous avons pu classer nos huiles essentielles comme bactéricides faibles, et nos résultats ne concordent pas avec la littérature dont la classification d'huile essentielle de Pin comme bactéricide moyen.

Sur la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que l'huile essentielle des feuilles de *Pinushalepensis* Mill. ayant une activité antibactérienne élève ce qui explique son utilisation fréquente dans la médecine traditionnelle. L'huile essentielle de *Pinushalepensis* Mill. peut être

une source non négligeable de substances antibactériennes qui peuvent être exploitées dans différents domaines.



Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques qui se trouvent dans la région des Aurès de Khenchela, nous nous sommes intéressées à l'étude d'une plante médicinale de la famille des Pinacées, *Pinushalepensis* Mill., qui est un arbre vivace, spontané, connu par les populations locales sous le nom de "Senouber", dégageant une forte et agréable odeur de résine. Cette plante médicinale est encore utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme anti-inflammatoire, analgésique et pour le traitement de la bronchite.

Dans le présent travail, différents extraits organiques sont étudiés avec les huiles essentielles de *Pinushalepensis* Mill. L'extraction de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés où l'extrait méthanolique exprime un rendement plus élevé que les autres, alors que le rendement des huiles essentielles est acceptable.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur huit souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disque, les résultats indiquent que l'extrait méthanolique exerce la plus forte activité antibactérienne vis-à-vis des huit souches testées, inversement à l'extrait d'éther de pétrole qui est le moins actif, au moment où les huiles essentielles exercent une forte activité antibactérienne sur les souches Gram positif par rapport aux Gram négatif. Tous les extraits organiques ont un effet sur les bactéries testées à l'exception de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Les CMI et les CMB sont déterminées sur milieu liquide pour toutes les souches ayant montré une sensibilité envers les différents extraits. Le rapport CMB/CMI permet de déterminer l'effet bactéricide ou bactériostatique de l'extrait, par exemple, l'extrait méthanolique qui possède un effet bactéricide sur toutes les souches et les huiles essentielles qui exercent un effet bactéricide moyen sur les souches testées.

En perspectives, plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité de ce travail entamé, tels que :

- Déterminer les molécules responsables de l'activité antibactérienne, approfondir l'étude phytochimique en utilisant des techniques plus performantes pour la détermination de la structure chimique de ces composés après leur purification;
- Optimiser les conditions d'extraction des métabolites secondaires par plusieurs techniques d'extraction et l'exploitation des résultats par des méthodes statistiques plus robustes ;
- Elargir le spectre des activités biologiques ciblées, en incluant les activités anti-inflammatoires, anti-enzymatiques, insecticides ou autres.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- Abdelouahid D.E. ; Bekhechi C., (2004). Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoidesverticillata* (Nounkha). *Virologie et Santé*. 10 (4) : 91-100.
- Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A.,Rebiahi S.A., Ziani Cherif C. et Bessiere J.M., (2011).Chemical composition and antifungal activity of Aleppopine essential oil, *Medicinal Plants Research*.5(22), 5433-5436.
- AFNOR, (2000). Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6^{ème} édition, Paris.
- Akroum S., (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat en sciences en physio-toxicologie. Univ.Mentouri, Constantine, pp : 6-23.
- Al-Bayati A.F., (2008). Synergistic antibacterialactivity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinellaanisum*essential oils and methanol extracts, *Ethnopharmacology*, (116) 403-406.
- Allion A., (2004). Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides. Thèsede doctorat en sciences alimentaires. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires.Pp :22-28.
- Ammari Y., Sghaier T., Khaldi A., Garchi S., (2001). Productivité du pin d'Alep en Tunisie: Table de Production. Annales de L'INGREF. N° Spécial, pp : 239-246.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.,(1992). Bactériologie clinique. 2^{ème} Edition. Ed. Marketing. 511p.

B

- Belaïche P., (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Maloine S.A., Tome I.
- Bellefontaine R.,(1979). Onze années d'amélioration génétique forestière. Annales de la recherche forestière au Maroc. Tome XIX : 15-48.
- Belloum Z., (2007). Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes, cas de l'espèce*Inulacrithmoides*. Thèse de Magister : 199, p27-83.

- Benjilali B., (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales: cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Institute agronomique et vétérinaire, Maroc,.
- Benmahdi A., (2001). Identification des Principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie*. 6: 11-27.
- Bentouati A., (2006). Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinushalepensis* Mill.) du massif de OuledYagoub (Khenchla-Aurès).Thèse Doctorat, Univ. Batna. 115p.
- Beernes H., Buttiaux R., Tacquet A., (1996). Manuel de techniques bactériologiques. 2^{ème} Ed. Paris. 572 p.
- Bouazza F., (2013). Intérêt de la mycorhization contrôlée du Chêne vert (*Quercus ilex* L.) et du Pin d'Alep (*Pinushalepensis* Miller) par deux espèces de Terfez, en conditions gnotoxéniques et axéniques. Mém. Magister, Univ. Oran, 99p.
- Boudjouref M., (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisiacampestris* L., thèse de Magister, Univ. Ferhat Abbas, Sétif. 99 p.
- Bouguenna S., (2011). Diagnostic écologique, mise en valeur et conservation des pineraies de *Pinushalepensis* de la région de Djerma (Nord-est du parc national de Belezma, Batna). Mém. Magister. Univ. Batna. 161p.
- Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., et Fairouz S. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimique de l'huile essentielle du géranium rosat (*pelargoniumgraveolens* L.) cultivé dans la plaine de mitidja (Algérie). *Nature et Technologie*. 3 :37-45.
- Bousseboua H., (2002). Eléments de Microbiologie Générale. Univ. Mentouri, Constantine. Pp : 145-156.
- Bouzidi N., (2016). Etude des activités biologiques de l'huile essentielle de l'armoise blanche «*Artemisia herba alba* Asso».Mémoire de Doctorat. Univ. Mustapha Stambouli de Mascara.p133
- Brochiero F., Chandieux O., Ripert C., Vennetier M., (1999). Autécologie et croissance du pin d'Alep en Provence calcaire. *Forêt méditerranéenne*. 20(2): 215-224.
- Bruneton J., (1993). Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Lavoisier. Paris, France. Pp 278-279.

- Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales internationales. Ed. Tec et Doc Lavoisier. 1120 p.

- Burt S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: pp.223-253.

C

- Calamassi R., Falusi M., Tocci A., (1984). Effet de la température et de la stratification sur la germination des semences de *Pinus halepensis* Mill. *Silva genetica*, 33 (4-5): 133-139.

- Chakroun M.L., (1986). Le pin d'Alep en Tunisie. Options Méditerranéennes. Série Etude CIHEAM, 86 (1): 25-27.

- Chagne D., (2004). Développement de marqueurs moléculaires chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) et cartographie génétique comparée des conifères, thèse de doctorat en biologie forestière. Univ. Henri Poincaré, Nancy 1.

- Charles S., (2008). Valorisation des extraits de pin GMS (*Pinus banksiana*) par l'étude de leur composition chimique et de leurs activités biologiques. Mémoire présenté à l'université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. 95p

- Chaumeil P., (2006). Plasticité moléculaire de deux écotypes de pin maritime soumis à un stress osmotique, thèse de doctorat en biologie forestière. Univ. Henri Poincaré, Nancy 1.

- Cohen Y., Jacquot C., (2001). Pharmacologie. 5^{ème} Ed. Masson. Paris. 350p.

- Coyle M.B., (2005). Manuel of antimicrobial susceptibility testing. American society for microbiology. P53-62.

D

- Dadi P.K., Ahmad M., Ahmad Z., (2009). Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.* 45 (1): 72-9.

- Daroui-mokaddem H., (2012). Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolumolusatrum* (Apiaceae), *Asteriscusmaritimuset Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). Thèse de Doctorat. 197, p15, 60.

- Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., (2010). GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3):pp.191-198.
- Diatta C., Gueye M., Akpo L E., (2013). Les plantes médicinales utilisées contre les dermatoses dans la pharmacopée Baïnouk de Djibonker, région de Ziguinchor (Sénégal). *Journal of Applied Biosciences*. 70 :5599–5607. ISSN 1997–5902.9, p 2.
- Dob T., Berramdane T., Chelghoum C., (2005). Chemical Composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes Rendus Chimie*. (8), 1935-1945.

E

- Edeaga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O., (2005). Photochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*. 4 (7) : 685-688.
- Elghozi J.L., Duval D. (1992). Pharmacologie 2^{ème} Ed : Médecine Flammarion. Paris. 289p.
- Eymard S., (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de Doctorat en génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des procédés : Spécialité Biochimie. Nante. France.

F

- Fady B., Semerci H., Vendramin G., (2003). EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Aleppo pine (*Pinus halepensis*) and Brutia pine (*Pinus brutia*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome (Italy), 6p.
- Fekih N., (2015). Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie. Thèse de Doctorat, Univ. Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. 133 p.
- Fernandez X., Chemat F., (2012). La chimie des huiles essentielles tradition et innovation. Vuibert. 247p.
- Ferron A., (1994). Bactériologie médicale. C et R Paris 1. 15 Ed. 472 p.
- Fiorucci S., (2006). Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire, Thèse de doctorat en chimie. Université Sophia Antipolis, Nice, 1-14.
- Francelet A., (1970). Stimulation de l'ouverture des cônes de pins. Institut National de

Recherches forestières Tunisien, Note technique. 13: 2-3.

- Francois J.C., (2002). Caractérisation par CPG /IK, CPG /SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat Univ. Pascal Paoli Corse.

G

- Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., Moreno-Arribas M.V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. (19): 835–841.

- Gausson H., (1960). Les Gymnospermes actuelles et fossiles. Fasc. VI, chap. XI, pp. 1-272.

-Ghanmi S., Bouazizi M. L., Bouhaddi N., (2005). Optimisation multiobjectifs en mécanique des structures : Approche basée sur les surfaces de réponse adaptative, 7^{ème} colloque national en calcul des structures, Giens, France.

- Guangrong H., Jiabin J., Dehui D., (2008). Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.* 7 (9): 1335-1338.

-Guerin-Fauble, Carret G., (1999). L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV-INRA. Pp : 5-12.

H

- Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer K.A., Carson C. F., Riley T. V., (1998). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86, 985-990.

- Haffane M., (1982). Contribution à l'étude du comportement de *Pinus halepensis* dans les reboisements de Zoumi Mokrisat. Mémoire 3^{ème} cycle, I.A.V. Hassan II, Rabat.

- Hammoudi R., (2015). Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien. Thèse de Doctorat, Univ. Kasdi Merbah, Ouargla. 152 p.

- Hazzit M., (2002). Arôme alimentaire. Thèse de magister. USTHB, Alger. p 96.

-Hellal Z., (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister, Univ. Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou. 78p.

- Heller R., Esnault R., Lance C., (1998). Physiologie végétale, nutrition. EdDunod, Pp : 285-305.
- Herzi N., (2013). Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Mémoire de Doctorat, Univ.detoulouse.172p.
- Hopkins W. G., (2003). Physiologie végétale. 2^{ème} édition : de Boeck. Pp : 267-281.
- Huang Guangrong., Jiang Jiabin.,and Dai Dehui. (2008).Antioxidativeand antibacterialactivity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal ofBiotechnol.*7 (9): 1335-1338.

J

- Jeantet R., Crogaennec T., Schuck P., Brule G., (2007). Sciences des aliments. LavoisierTec et Doc, Paris., (2). Pp : 404-406.
- Jürgen R., Paul S., Ulrike S., Reinhard S., (2009). Essential Oils of Aromatic Plantswith Antibacterial,Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview:*ForschKomplementmed.*16: 79–90.

K

- Kadik B., (1987). Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinushalepensis*Mill.) En Algérie: Ecologie, dendrométrie, morphologie. Ed. OPU. Alger., 581p.
- Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO., (2004). Identification of active principles of *M. balsamina*(Balsam Apple) leaf extract.*J Med Sci.* 4(3):179-182.
- Kebieche M., (2009). Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante*Ranunculus repens* L. : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine.Thèse de Doctorat en sciences. P : 15-22.
- Kechkar M., (2008). Extraction de la *Silymarine* et étude de son activité antimicrobienne, mémoire de magister en microbiologie appliquée, Univ.Mentouri, Constantine. 30-36.
- Kempf S., Zeitouni A. (2009). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences. Pathologie Biologie : *article in press.*

-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 Journal of Natural Products. 2 (1) : 18-26.

- Krief S., (2004). 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. Thèse de Doctorat. Pp : 23, 24, 201, 205.

L

-Ladjal S., (2012). Activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de la région de M'sila. Mém. Magister. Univ. Sétif. 76p.

-Lahouati R., (2000). Expérience des Plantations en Climat Aride. Cas de la Ceinture Verte en Algérie. Direction Générale des forêts, Ministère de l'Agriculture, Alger.

- Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J., Lee C. Y., (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* (51): 7292-7295.

- Lesley B., (1996). Plantes médicinales et aromatiques. Ed. Lavoisier, Paris. 213p.

-Lieutaghi P., (2004). Le livre des Arbres, Arbustes et Arbisseaux. ACTES SUD. 1322p.

-Lucchesi M.E, (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Univ. de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies. 78p.

M

-Maestre F.T., Cortina J., (2004). Insights into ecosystem composition and function in a sequence of degraded semiarid steppes. *Restoration Ecology*. (12): 494-502.

- Mann C.M., Markhan J.L., (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 538-544.

-Meena M.R., Sethi V., (1994). Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *J. Food Sci and Tech. Mysore* N°31, pp. 68-70.

-Meyer A., Deiana J., Bernard A., (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} Ed. Biosciences et techniques. Pp : 217-247.

-Mirov N.T., (1955). Relationships between *Pinus halepensis* and other insigne pines of the Mediterranean region. Bull. Res. Council. : 65-72.

-More D., White J., (2005). Encyclopédie des Arbres, plus de 1800 espèces et variétés du monde. Flammarion. P: 230-231.

-Morel S., (2011). Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (*Fabaceae*), Thèse de doctorat. Univ. d'Angers, 39-76.

-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. Univ. Abou Beker Belkaid. 160p.

- Muanda F., (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat. P : 15, 16, 71, 74.

N

-Nahal I., (1962). Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill). Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. Annales E.N.E.F., Nancy, 19: 475-686.

-Nahal I., (1962). Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. Ann. Ecole eaux et forêts. Sta. Rech. Exp. 19 (4). 208p.

-Nahal I., (1986). Taxonomie et aire géographique des pins du groupe *halepensis*. Série Etude CIHEAM 86/1. pp. 1-9.

-Nauciel. C., Vildé J.L., (2005). Bactériologie médicale, 2^{ème} Ed. Masson. Paris. Pp: 5-10.

-Nicault A., Rathgeber C., Tessier L., Thomas A., (2001). Croissance radiale et densité du bois du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en relation avec les facteurs climatiques. Analyse *in situ* de la mise en place du cerne. Ann. For. Sci. (58): 769-784.

O

- Ohemeng.K.A, Schwender.C.F, Fu.K.P, Barrett.J.F., (1993). DNA gyraseinhibitory and antibacterialactivity of someflavones.*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3 (2): 225-30.
- Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennd K.N., Kanko C., Ahibo C., Casanovad J., (2008). Etude chimique et activitéanti diarrhéique des huiles essentielles de deux plantesaromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of ScientificResearch.* 1 (24). Pp : 94-103.
- Ozenda P., (2006). Les végétaux: organisation et diversité biologique. Ed. Dunod (2ème Ed.), Paris, 516 p.

P

- Padrini F., Lucheroni M.T., (1996).Le grand livre des huiles essentielles. Ed. de Vecchi.
- Panetsos C.K.P.,(1980). Monograph of *Pinushalepensis* Mill. And *Pinusbrutia*Ten. Annales Forestales, Zagreb. (9) : 2. pp. 39-77.
- Parde J., (1957). La productivité des forêts de pin d'Alep en France. Ann., E.N.E.F et Sta. Rech. Exp. 15 (2): 367-414.
- Penchev P.I., (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions.Thèse de Doctorat ,Univ. Toulouse.218 p.
- Perry J.J., Staley J.T., Lory S., (2004). Microbiologie. Cours et questions de révision. Ed. Dunod.
- Pibiri M.C., (2005).Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat.Poltechniques fédérale de Lausanne.
- Pingot A., (1998).Les huiles essentielles. Éd. Tec et Doc, Paris. Pp 230-236.
- Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C.,Roura S.I.,(2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm-Wiss.u.-Technol.*36.Pp. 679-684.

Q

- Quan L., Li S.F., Tian S.J., Xu H., Lin A.Q. et Gu L., (2004). Determination of organochlorine pesticides residue in Ginseng root by orthogonal array design Soxhlet Extraction and gas chromatography. *Chromatographia* 1, 89–93,
- Quezel P., (1976). Les forêts du pourtour méditerranéen. In *Forêts et maquis méditerranéens: écologie, conservation et aménagement*. Note technique MAB, UNESCO, Paris, (2): 9-33.
- Quezel P., (1979). La Région Méditerranéenne française et ses essences forestières. Signification écologique dans le contexte circum-méditerranéen. *Font Medit.* 1 (1): 7-18.
- Quezel P., (1985). Definition of the Mediterranean region and the origin of its flora. In Gomez-Campo C. Ed., *Plant conservation in the Mediterranean area*, "Geobotany"7, Junk Pub., Dordrecht. pp. 9-24.
- Quezel P., (1986). Les pins du groupe « *halepensis* ». *Ecologie, végétation, Ecophysiologie*. CIHEAM- Option méditerranéenne. 86 (1): 11-23.
- Quezel P., (2000). Taxonomy and biogeography of Mediterranean pines (*Pinushalepensis* and *Pinusbrutia*). In: *Ecology, Biogeography and Management of Pinushalepensis and P. Brutia Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin*. Eds., Néeman G., Trabauds L., Backhuys Publishers, Leiden, pp. 1-12.
- Quezel P., (2000). *Réflexions sur l'évolution de la flore et de la végétation au Maghreb méditerranéen*. Ibis Presse, Paris, 117p.
- Quezel P., Barbero M., (1992). Le pin d'Alep et les essences voisines: répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. *Forêt méditerranéenne*, 8(3):158-170.
- Quezel P., Médail F., (2003). *Écologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Eds. scientifiques et médicales, Elsevier SAS. Paris, pp. 28-125.

- Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H.S., Raherimandimby M. et Danthu P., (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*, *Food Chemistry*, (114). 680-684.

S

-Saadou N., (2008). Etude et caractérisation chimique des huiles essentielles du genre *Pinus*, dans le Parc National d'El Kala (P.N.E.K.). Mémoire de Magister. Univ. Badji Mokhtar – Annaba. 93p.

- Saadou N., Seridi R., Djahoudi A. et Hadeff Y., (2015). Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Rev. Sci. Technol., Synthèse* 30: 33-39.

-Sablonnière B., (2002). Biologie microbiologie. Ellipses Ed., Paris, 270-273.

- Sandri I.G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A.P.L., Echeverrigaray S., (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against food borne pathogens and spoiling bacteria, *Food Chemistry*, (103), 823-828.

-Sarker S.D., Latif Z., Gray, A.I., (2006). Natural Products Isolation, Second Edition, Humana Press Inc.

-Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro H., Tanigaki S., Iinuma M., (1995). Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother. Res.* 9(7): 509-12.

- Serre F., (1976a). Les rapports de la croissance et du climat chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). I- Méthodes utilisées. L'activité cambiale et le climat. *Acta Oecol./Oecologia plantarum* 2 (2): 143- 171.

-Souleres G., (1969). Le pin d'Alep en Tunisie. *Ann. Ins. Hist. Nat. Afr., Nord. Alger.* 59 (4): 23-36.

- Svoboda K.P., Hampson J.B., (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities.

T

- Trease E. et Evans W. C., (1987). Pharmacognosybilliaire. InTindall, éditeur: Techniques et Documentation, London. 61-62.

U

-Upton A., (2006). Les produits antimicrobiens à domicile. Le problème de l'antibiorésistance. *Énoncé de la SCP*, 11(3) : 177-181.

V

- Valérie B., (2008). Les propriétés antiangiogéniques des flavonoïdes, Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en chimie. Université du Québec à Montréal, 37-44.

W

-Wilkinson J.M., (2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts.ChapiterVIII.pp. 157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning MedicinalPlants into Drugs. Ed. WILEY-VCH VerlagGmbH& Co. KGaA, Weinheim, 405p.

-William, B.J., (2007).The original of the soxhlet extractor.Journal ofChemical Education. (84), n°12, Canada, pp 1913.

X

- Xianfei X., Xiaoqiang C.,Shunying Z.G., (2007).Chemical composition and antimicrobial activity ofessential oils of *Chaenomelesspiciosa*from China, *FoodChemistry*.(100), 1312-1315.

Y

- YakhlefG., (2010). Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurusnobilis*. Mémoire de Magister. 69, p5- 43.

Z

- Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub A. et Gharsallah N., (2011). The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia, *Lipids in Health and Disease*, (10), 161.

Annexes

Annexes

Annexe N°1 :**Composition des différents milieux utilisés****❖ L'eau physiologie :**

Chlorure de sodium9 g
Eau distillé1000 ml

❖ Mueller-Hinton :

L'extrait de viande.....300 ml
Peptone de Caséine17,5 g
Amidon..... 1,5 g
Agar17g
Eau distillé1000 ml
pH7.4

❖ Gélose nutritive

L'extrait de viande..... 3 g
Peptone5 g
Agar15 g
Eau distillé1000 ml

❖ Préparation de l'étalon de turbidité McFarland 0,5

- 1-** Ajouter 0,5 mL d'une solution à 0,048 mol/L de BaCl₂ (1,175% p/v BaCl₂·2H₂O) à 99,5 ml d'une solution 0,18 mol/L (0,36 N) de H₂SO₄ (1% v/v) et agiter vigoureusement.
- 2-** Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et des cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13.
- 3-** Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.
- 4-** Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- 5 -** Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un Vortex.
- 6-** Renouveler l'étalon ou vérifier son absorbance après 6 mois de conservation.
- 7-** Il convient de vérifier les étalons achetés dans le commerce en s'assurant que l'absorbance se situe dans les limites fixées.

Annexe N°2 : Caractéristique des souches utilisées.

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Souche pathogène	La forme	Le type respiratoire
<i>Listeria monocytogenese</i>	25922	+	non	Bacille	aérobie
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	oui	cocci	Aérobie anaérobie facultatif
<i>Acenetobacterbaumannii</i>	19606	-	non	Cocco-bacille	Aérobie
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	non	bacille	Aérobie
<i>Klebsiellaoxytoca</i>	25922	-	oui	bâtonnet	Aérobie anaérobie facultatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	oui	bacille	Aérobie
<i>Salmonella sp</i>	/	-	oui	bacille	Aérobie
<i>Proteus mirabilis</i>	/	-	oui	bacille	Aérobie anaérobie facultatif

(Avril et al., 1992)

Nom et Prénom Lebsir Rabiha Mahsoudi Cherifa	Date de soutenance Le 02/07/2017
Thème: Etude phytochimique et Evaluation de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> des extraits de la plante <i>.Pinus halepensis</i> Mill	
Master Académique en Biologie Option Microbiologie Appliquée	
Résumé L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits organiques de la plante médicinale <i>Pinus halepensis</i> Mill. Ses extraits organiques sont obtenus par Soxhlet en utilisant quatre solvants de polarité croissante : l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Les rendements respectifs sont : 1,44 %, 10,12 %, 5,26 % et 20,41 %. Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Le rendement en huile essentielle (HE) a fourni un taux de 0,96%. L'analyse phytochimique réalisée a permis de constater la présence des quatre grands groupes chimiques : les tanins, les flavonoïdes, les saponines et les alcaloïdes dans l'extrait MeOH alors que l'extrait EtP ne contient que les saponines ; tandis que l'extrait AcEt contient tous les familles recherchées à l'exception des alcaloïdes. L'extrait Chl ne contient que les saponines et les tanins. L'activité antibactérienne est déterminée sur huit souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disque. Les résultats trouvés ont montré que l'extrait MeOH exerce la plus forte activité vis-à-vis des huit souches testées, à l'inverse de l'extrait EtP qui est le moins actif. Les huiles essentielles exercent une forte activité antibactérienne sur les souches Gram positif par rapport aux Gram négatif. Tous les extraits organiques ont un effet sur les bactéries testés sauf sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Les CMI et les CMB ont été déterminées sur milieu liquide. La comparaison entre les valeurs des CMI et CMB a montré que l'huile essentielle a un effet bactéricide moyen vis-à-vis les souches testées tandis que les extraits EtP et Chl ont un effet bactériostatique mais l'extrait AcEt exerce d'une part un effet bactériostatique vis-à-vis certaines souches et d'autre part un effet bactéricide contre d'autres souches et l'extrait MeOH exerce un effet bactéricide envers les souches testées.	
Mots clés : <i>Pinus halepensis</i> Mill., screening phytochimique, extraits organiques, huiles essentielles, activité antibactérienne, CMI, CMB	
Président : Mr HABIBATNI Sofiane MAA Université Abbes LAGHROUR, Khenchela Examineur : Melle BOUTAFRA soumia MAA Université Abbes LAGHROUR, Khenchela Rapporteur : Melle DELLAA Yasmina MAA Université Abbes LAGHROUR, Khenchela	