

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



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Physiologie cellulaire et physiopathologie

Présenté par :

ARAB Souad & OUCHICHI Tassadit

Thème

*Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait de l'écorce de
pinus pinaster*

Soutenu le : 22/ 09/ 2018

Devant le jury composé de :

M. LAMINE S.	MAA	Univ. de Bouira	Président
M. LIBDIRI F.	MAA	Univ. de Bouira	Promoteur
M ^{eme} . CHERIFI Z.	MCB	Univ. de Bouira	Examinatrice

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

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

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

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

réalisation de ce travail en particulier à:

Notre encadreur Monsieur Libdirí Faríd maître de conférences à l'université de Bouira, pour avoir accepté de nous encadré, et qui a proposé le thème de ce mémoire,

et pour ses conseils qui ont amélioré la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions également messieurs les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous

ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement

:

Monsieur LAMINE S, le chef département à l'université de Bouira pour accepter de présidé ce jury, Madame CHERIFI Z pour accepter d'examiner ce travail.

Les personnels de laboratoire de microbiologie de l'université de Bouira. Tous les enseignants qui ont contribué à nos former durant le cycle d'étude.

(Tassadit et Souad)

Dédicaces

A mon père

Ta sagesse et ton courage ont toujours été sécurisants pour moi. Tu es aussi un

travailleur exemplaire et infatigable, avec tes modestes moyens, tu as toujours subvenu à nos besoins, tu as rempli pleinement ton rôle de père.

Que Dieu fasse que je continue à bénéficier longtemps encore de tes conseils.

A Ma mère

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

A mes très chers sœurs : Fatima, Fatiha

A mes frères : Kamel, Hocin, Yahia,

Aïssa, Rachid, Ahmed

A toute ma grande famille et voisins.

A mon binôme Souad

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

Merci d'avoir toujours partagé avec moi les moments de joie et de peine, Recevez à

ce travail en témoignage de tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

A toute promotion physiologie cellulaire 2018.

A tous mes enseignants du cycle primaire à l'université, pour la connaissance que

vous m'avez transmis, à vous tous mes respects.

A tous ceux qui me sont chers. Je dédie ce modeste travail.

Tassadit

Dédicaces

A mon père

Ta sagesse et ton courage ont toujours été sécurisants pour moi. Tu es aussi un

travailleur exemplaire et infatigable, avec tes modestes moyens, tu as toujours subvenu à nos besoins, tu as rempli pleinement ton rôle de père.

Que Dieu fasse que je continue à bénéficier longtemps encore de tes conseils.

A Ma mère

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

A mes très chers sœurs : Khadidja, Djamila, Karima

A mes frères : Kamel, Nabil, Toufik

A toute ma grande famille et voisins.

A mon binôme Tassadit

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

Merci d'avoir toujours partagé avec moi les moments de joie et de peine, Recevez à

ce travail en témoignage de tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

A toute promotion physiologie cellulaire 2018.

A tous mes enseignants du cycle primaire à l'université, pour la connaissance que

vous m'avez transmis, à vous tous mes respects.

A tous ceux qui me sont chers. Je dédie ce modeste travail.

Souad

SOMMAIRE

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviation	
Introduction générale	1
Partie I : Etude bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales et les antibiotiques	
I.1. les plantes médicinales.....	3
I.1.1. Définition d'une plante médicinale.....	3
I.1.2. Intérêt de l'étude des plantes médicinales	3
I.1.3. La phytothérapie	3
I.1.3.1. Différents types de la Phytothérapie	3
I.1.3.2. Modes de Préparation des Plantes pour la Phytothérapie.....	4
I.2. les antibiotiques.....	5
I.2.1. Historique	5
I.2.2. Définition.....	5
I.2.3. Mode d'action des antibiotiques et Résistance bactérienne.....	6
I.2.4. Toxicité des antibiotiques	7
Chapitre II : Monographie de la plante	
II.1. Origine et répartition	8
II.2 Noms vernaculaires.....	10
II.3. Systématique.....	10
II.4. Présentation et description botanique	11
II.5. Métabolites de la plante.....	13
II.5.1. Métabolites secondaire.....	14
II.5.1.1. Les composés phénoliques ou Les polyphénols.....	14
II.5.1.1.1. Les flavonoïdes.....	14
II.5.1.1.2. Les tanins.....	15
II.5.1.1.3. Les cumarines.....	16

II.5.1.2. Les saponines.....	16
II.5.1.3. Les terpènes.....	16
II.5.1.4. Les stérols.....	17
II.5.1.5. Les alcaloïdes.....	17
II.5.1.6. Les stilbènes.....	17
II.5.1.7. Les résines et les baumes.....	17
II.6. Utilisation thérapeutique	18
II.6.1. Activité anti-oxydante de <i>pinuspinaster</i>	18
II.6.2. Activité antidiabétique et anti-inflammatoires de pin maritime	18
II.6.3. Les effets pharmaceutiques et nutraceutiques de l'extrait d'écorce de <i>Pinuspinaster</i>	19

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I.1. Matériel	21
1.1. Matériel végétal	21
1.2. Matériel microbiologique.....	22
I.2. Méthodes.....	23
I.2.1. Préparation des extraits.....	23
I.2.1.1. préparation de l'extrait aqueux	23
I.2.1.2. préparation de l'extrait alcoolique par macération dans l'éthanol 70%.....	23
I.2.1.3. préparation de l'extrait hydro éthanolique	24
I.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	26
I.2.2.1. Préparation des extraits aqueux	26
I.2.2.2. Préparation de milieux de culture.....	26
I.2.2.3. Préparation de l'inoculum.....	27
I.2.2.4. Technique de diffusion en puits	27
I.2.2.5. L'antibiogramme	27
I.2.3. Détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose	27

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Extraction	28
II.1.1.Rendement des extraits	28
II.2.Les principaux constituants de la plante	28
II.3. L'activité antibactérienne	30
II.3.1. Activité antibactérienne des extraits d'écorce de <i>pinuspinaster</i>	30
II.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	35
II.3.3.1.Activité antibactérienne des extraits sur <i>Staphylococuss aureus</i>	36
II.3.3.2.Activité antibactérienne des extraits sur <i>Escherichia coli</i>	37
Conclusion.....	41

Liste des figures

Figure 01: Lieux d'action des antibiotiques dans la cellule bactérienne	6
Figure 02: Distribution de pinuspinaster en Europe et en Afrique du nord.....	9
Figure 03: Photographie de pin maritime.....	11
Figure 04: Photographie d'écorce de pin maritime.....	13
Figure05: Photographie montre les aiguilles et les Cônes de pin maritime	13
Figure 06: Structure générale du noyau des flavonoïdes	15
Figure 07: montre la Structure des tannins condensés.....	15
Figure 08: montre la Structure des Coumarines.....	16
Figure 09: Formule chimique d'isoprène.....	16
Figure 10: Structure des stilbènes.....	17
Figure 11 : Le Pycnogenol.....	20
Figure 12: photographie de l'étuve à ventilation.....	24
Figure 13: Extraction des substances végétales.....	25
Figure 14: Flavan-3-ols: épicatechineet catéchine.....	30
Figure 15: Activité antibactérienne des extraits végétaux par rapport aux antibiotiques.....	32
Figure 16: a/Effet antibactérien des extraits végétaux.....	34
Figure 17: Effet des Antibiotiques : pénicilline et céphaloxine, sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcusfaecalis</i>	35
Figure 18: Effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Figure 19: Effet antibactérien des extraits végétaux dilués (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) sur <i>Staphylococcus aureus (S)</i> ,.....	37
Figure 20: Effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur <i>Escherichia coli</i>	38
Figure 21: Effet antibactérien des extraits végétaux dilués (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) sur <i>Escherichia coli (E)</i>	39

Liste des tableaux

Tableau 01 : répartition de pinuspinaster dans le monde.....	10
Tableau 02: Nature et origine du matériel biologique utilisé.....	21
Tableau 03: Souches bactériennes testées.....	22
Tableau 04 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	31
Tableau 05: Effet inhibiteur des Antibiotiques sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	31
Tableau 06: Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Tableau 07: Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur la culture d' <i>Escherichia coli</i>	37

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source immense de molécules bioactives, dotées de nombreuses activités. L'objectif de notre travail est de réaliser une étude phytochimique et biologique des extraits aqueux, éthanolique, hydroalcooliques de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI). Cette espèce de plante algérienne est utilisée en médecine traditionnelle.

Le criblage phytochimique a montré que cette plante contient des flavonoïdes, des stérols et terpènes, des tanins et des coumarines, des alcaloïdes.

Des travaux ont été effectués dans le but de mettre en évidence *in vitro* les propriétés antibactériennes de ces extraits des écorces de *pinus pinaster*, les effets des extraits ont été comparés à celle de l'ampicilline, pénicilline, céphalexine comme un contrôle positif. Par la méthode de diffusion en milieu solide (puits), et la méthode de diffusion en milieu liquide (CMI), l'extrait hydroéthanolique de PPI montré une activité antibactérienne plus élevée sur *E.fécalis* que les extraits.

Summary

Medicinal plants are a huge source of bioactive molecules with many activities. The objective of our work is to carry out a phytochemical and biological study of the aqueous, ethanolic, hydroalcoholic extracts of the bark of *Pinus pinaster* (PPI). This species of Algerian plant is used in traditional medicine.

Phytochemical screening has shown that this plant contains flavonoids, sterols and terpenes, tannins and coumarins, alkaloids.

Work was carried out to demonstrate *in vitro* the antibacterial properties of these extracts of *pinus pinaster* bark, the effects of extracts were compared to that of ampicillin, penicillin, cephalexin as a positive control. By the solid medium diffusion method (wells), and the diffusion method in liquid medium (MIC), the hydroethanolic extract of PPI showed a higher antibacterial activity on *E. fecalis* than the extracts.

Liste des figures

Figure 01: Lieux d'action des antibiotiques dans la cellule bactérienne	6
Figure 02: Distribution de pinuspinaster en Europe et en Afrique du nord.....	9
Figure 03: Photographie de pin maritime.....	11
Figure 04: Photographie d'écorce de pin maritime.....	13
Figure 05: Photographie montre les aiguilles et les Cônes de pin maritime	13
Figure 06: Structure générale du noyau des flavonoïdes	15
Figure 07: montre la Structure des tannins condensés.....	15
Figure 08: montre la Structure des Coumarines.....	16
Figure 09: Formule chimique d'isoprène.....	16
Figure 10: Structure des stilbènes.....	17
Figure 11 : Le Pycnogenol.....	20
Figure 12: photographie de l'étuve à ventilation.....	24
Figure 13: Extraction des substances végétales.....	25
Figure 14: Flavan-3-ols: épicatechine et catéchine.....	30
Figure 15: Activité antibactérienne des extraits végétaux par rapport aux antibiotiques.....	32
Figure 16: a/ Effet antibactérien des extraits végétaux.....	34
Figure 17: Effet des Antibiotiques : pénicilline et céphaloxine, sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	35
Figure 18: Effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Figure 19: Effet antibactérien des extraits végétaux dilués (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) sur <i>Staphylococcus aureus</i> (S),.....	37
Figure 20: Effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur <i>Escherichia coli</i>	38
Figure 21: Effet antibactérien des extraits végétaux dilués (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) sur <i>Escherichia coli</i> (E).....	39

Liste des tableaux

Tableau 01 : répartition de pinuspinaster dans le monde.....	10
Tableau 02 : Nature et origine du matériel biologique utilisé.....	21
Tableau 03 : Souches bactériennes testées.....	22
Tableau 04 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	31
Tableau 05 : Effet inhibiteur des Antibiotiques sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	31
Tableau 06 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Tableau 07 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur la culture d' <i>Escherichia coli</i>	37

Liste d'abréviation

ADN : Acide Désoxyribose Nucléaire

ARN : Acide ribose Nucléaire

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

D : Diamètre d'inhibition

E.faecalis : *Enterococcus faecalis*

E.Coli : *Escherichia coli*

EE : Extrait Ethanolique

EHE : Extrait hydroéthanolique

ETA : Extrait Totaux Aqueux

g : gramme

M : Masse

mg : milligramme

ml : millilitre

mm : millimètre

NO : Oxyde nitrique endothélial

OH : groupement hydroxyle

PBE : Extrait d'écorce de *pinus pinaster*

PYC : Pycnogenol

PP : *pinus pinaster*

R : Radical

R% : Rendement

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

ufc : unité formant colonie

V : volume

% : pourcentage

Introduction

Bien avant que l'humanité ne découvre l'existence de les microbes, l'idée que certaines plantes ont un potentiel de guérison, en effet, ils contenaient ce que nous caractériserions actuellement comme principes antimicrobiens, était bien accepté (Rios et Recio, 2005). Depuis l'antiquité, les plantes médicinales sont connues par ces propriétés antimicrobiennes et ces avantages (athamena *et al.* , 2010), ces plantes considérées comme le fondement de la médecine moderne pour le traitement et la prévention des maladies humaines. À ce jour, de nombreux produits naturels ont été extrait à partir des écorces des plantes (Kumarasamy *et al.* ,2002), grâce à leurs composants fondamentaux qui possèdent plusieurs activités biologiques, nombreuses études intéressent à l'évaluation de ces activités (Sadou *et al.*, 2015).

La plupart des plantes médicinales les plus riches dans le monde et les plus utilisées soit comme aliments naturels ou pour des buts thérapeutiques on les trouve dans le continent africain. (Zeghad, 2009)

En médecine moderne, Malgré l'utilisation des antibiotiques a un grands succès pour le traitement des maladies infectieuses, mais la progression de la résistance bactérienne et l'absence réelles de découverte de nouveaux antibiotiques dans les années à venir, deviennent un problème thérapeutique qui conduit à étudier l'efficacité des plantes afin d'isoler les principes actifs (Toty *et al.* , 2013), car la phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme(Zeghad, 2009).

En 2002, selon l'OMS, 80% de la population africaine se soigner par la médecine traditionnelle qui implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales pour le traitement des maladies courantes. (Basli *et al.* , 2012).

L'extrait d'écorce du Pinus pinaster a une longue histoire d'utilisation éthnomédicale, il a été utilisé par les Indiens autochtones du Québec, L'explorateur français Jacques Cartier et son équipage ont introduit le thé d'écorce de pin au cours de l'hiver pour prévenir la scorie causée par l'insuffisance de vitamine C.

L'extrait d'écorce du Pinus pinaster est disponible commercialement comme suppléments alimentaires à base de plantes sous le nom de pycnogenol.

L'objectif de notre travail est donc de préparer des extraits aqueux , ethanologique, hydroéthanologique à partir de l'écorce de pinus pinaster et detecter la richesse de cette plante en principes actifs (polyphénols) et d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne de notre plante en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait actif à l'égard des germes bactérien testés.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Le premier ,est un aperçu bibliographique sur les plantes médicinales et les antibiotiques .

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de plante médicinale (pinus pinaster), le nom scientifique et la taxonomie,la description botanique, l'origine et la répartition géographique, les propriétés thérapeutiques de cette plante.

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

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

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

I.1. Les plantes médicinales

I.1.1. Définition d'une plante médicinale

La pharmacopée française définit la plante médicinale comme une « drogue végétale » grâce à leurs propriétés médicamenteuses.

Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisées fraîches ou sèches. (kahlouche-riachi, 2014).

I.1.2. Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir sur l'organisme humain et animal et elles présentent des avantages dépourvus dans les médicaments (Nelly, 2013); grâce à technologies modernes aux connaissances traditionnelles, 25% des médicaments modernes sont dérivés de plantes médicinales (El Hilah *et al.*, 2015).

Chaque partie de la plante possède des propriétés thérapeutiques, donc on peut utiliser la plante entière ou seulement une partie (feuilles, fruits, fleurs, écorce...) (Nelly, 2013).

Principe actif :

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

I.1.3. La phytothérapie

Définition

La phytothérapie (En grec, *Phyton* = végétal et *Therapein* = soigner) est l'art de soigner par les plantes, permet à la fois de traiter le terrain du malade et les symptômes de sa maladie (Nelly, 2013). La phytothérapie est une discipline qui tend toujours à se renouveler, car la recherche des nouveaux médicaments est continuelle (Sadou *et al.*, 2015).

I.1.3.1. Différents types de la Phytothérapie :

➤ **Aromathérapie :** Ce mot vient du latin « *aroma* » signifiant odeur et du grec « *therapeia* » signifiant traitement. Il s'agit donc de soigner par les huiles essentielles (Pierron, 2014), sa naissance était en 1928 par René Maurice Gattefossé qui, en travaillant sur les parfums. (Benzeggouta, 2005).

- **Gemmothérapie** : Se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules.
- **Herboristerie** : c'est la méthode la plus classique et la plus ancienne, elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

I.1.3.2. Modes de Préparation des Plantes pour la Phytothérapie :

Pour obtenir des extraits en traitant la plante dans une solution vaporisable (éther, eau, alcool,...) par divers procédés d'extraction (macération, infusion,) puis en évaporant.

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

1) L'Infusion

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

2) La Décoction

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

3) La Macération

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

I.2.Les Antibiotiques

I.2.1.Historique

Après la découverte du rôle pathogène des microbes, Pasteur est penché vers l'immunologie et la préparation des vaccins. Bien que la recherche de nouveaux médicaments antibactériens est poursuivie.

Vers 1909, Ehrlich introduit une notion thérapeutique aux médicaments «sélectivement toxiques" pour les microbes sans endommager les cellules animales ou humaines.

En 1928, Fleming découvre que quelques boîtes cultures des Staphylocoques contaminées par une petite tache verte, l'espace environnant contient une moisissure, et les bactériesensemencées étaient inhibées. La moisissure, c'était *Penicillium notatum* qui sécrétait un suc capable de détruire différentes bactéries. Il testa alors le suc sur une goutte de sang, sur des animaux de laboratoire, puis sur un homme volontaire, pour déduire enfin que le suc du *Penicillium* qu'il nomma "Pénicilline", n'était pas nuisible à l'homme, en plus de son action destructive vis-à-vis des bactéries pathogènes (Benzeggouta, 2005).

I.2.2.Définition:

Le terme antibiotique crée par Waksman, Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes; ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes (bactéries), dans lesquelles elles pénètrent en perturbant le métabolisme, mais sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales.

L'activité d'antibiotique peut s'exercer par deux mécanismes principaux: les antibiotiques qui stoppent la croissance des microbes, appelés bactériostatiques, et ceux qui les tuent sont appelés bactéricide (Afif Chaouche, 2015)

Selon leur formule chimique, la manière dont-ils agissent sur les microorganismes, les antibiotiques sont groupés en dix familles: les bêtalactamines, les aminosides, les phénicolis, les tétracyclines, les polypeptides, les macrolides, les antituberculeux, les antifongiques, les antimétabolites et les antibiomimétiques (Benzeggouta, 2005).

I.2.3. Mode d'action des antibiotiques et Résistance bactérienne:

A la différence des antiseptiques, les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes précises, à des concentrations mille à dix mille fois plus faibles que les antiseptiques. Chaque famille d'antibiotiques ayant un nombre de molécules très variable et une structure de base identique.

Le critère le plus utilisé pour classer les antibiotiques est la cible anatomique ou moléculaire au niveau de la bactérie. On compte trois classes (Fig.1):

- ✚ Antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi bactérienne (les familles des B-lactamines, aminoglycosides et certains antituberculeux);
- ✚ Antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines par les bactéries, comme les aminoglycosides, les tétracyclines, les phénicoles, les macrolides, les lincosamides et les streptogramines ;
- ✚ Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'ADN ou de l'ARN bactérien ; cas des sulfamides, des quinolones.

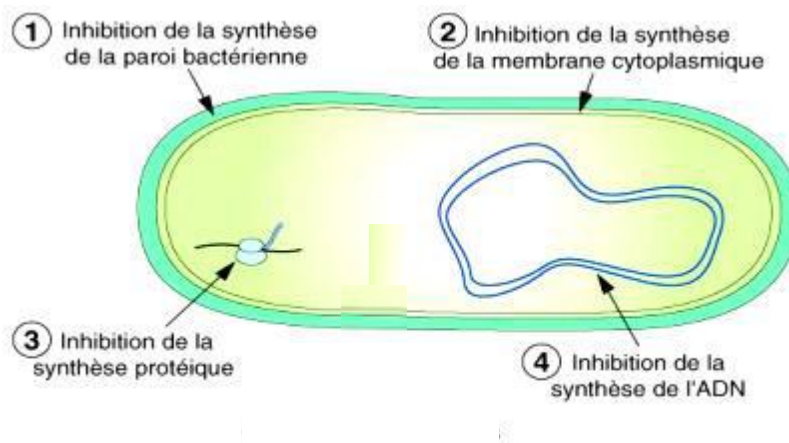


Figure 1: Lieux d'action des antibiotiques dans la cellule bactérienne (Afif Chaouche, 2015).

En revanche, les bactéries avaient trouvé les moyens pour résister et par conséquent, éviter l'action des antibiotiques, et se développer en présence d'une concentration en antibiotique plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce. Il faut distinguer la résistance innée ou naturelle, de la résistance acquise apparaissant chez des bactéries sensibles aux antibiotiques. Celle-ci, correspond à une adaptation des bactéries aux antibiotiques, qui est due soit à des mutations, soit à la présence de nouveaux gènes portés par des plasmides ou des transposons (Afif Chaouche, 2015).

I.2.4.Toxicité des Antibiotiques :

En plus de son action sur les bactéries, un antibiotique peut exercer des effets néfastes sur les cellules eucaryotes lorsque la dose administrée est trop élevée ou le traitement est de longue durée. Par ailleurs, certains antibiotiques peuvent augmenter les effets thérapeutiques et toxiques de médicament en inhibant leur fixation, ou leur inactivation dans l'organisme.

Il faut noter que les troubles toxiques causés par les antibiotiques sont différents d'une famille à l'autre, il peut y avoir une molécule très toxique et l'autre dépourvue de toxicité ou peu toxique. Cas de la streptomycine qui n'est pas toxique pour le néphron, alors que la néomycine est la plus toxique pour cet organe.

✚ Toxicité Hépatique:

Le traitement par la tétracycline cause une dégénérescence graisseuse du parenchyme hépatique, et les antituberculeux induire la lyse hépatocytaire (cytolyse).

✚ Toxicité rénale:

Une nécrose du tube contourné proximal est observée lors de l'administration d'un aminoside à posologie trop élevée.

✚ Toxicité du système nerveux et des organes sensoriels:

Une neuropathie sensitivo-motrice périphérique représente l'un des effets indésirables sur le système nerveux le plus souvent observé lors de l'utilisation d'antibiotique isoniazide. (Benzeggouta,2005).

Pinus pinaster

Les conifères sont des végétaux ligneux les représentants actuels des gymnospermes. Ce sont des arbres ou des arbustes, connus sous le nom de résineux. Ils diffèrent aux autres arbres (angiospermes), ils portent des aiguilles et des canaux sécréteurs de la résine dans tous ces organes. Ces espèces montrent des capacités d'adaptation incroyables à de nombreux environnements.

Les pins (genre *Pinus*) appartiennent à la famille des Pinaceae. Sont des arbres caractérisés par des aiguilles pointues, longues ou courtes, des graines ailées. (Chagne, 2004)

II.1.Origine et répartition :

Le pin maritime (*pinus pinaster*) se répartit près des côtes atlantiques du sud-ouest européen et méditerranéennes occidentale (Pauly *et al.* , 1973), en Espagne, en Italie, Il est plus rare en Afrique de Nord (région de Bône en Algérie et dans le Moyen Atlas au Maroc).

En France, le pin maritime de la côte de Gascogne appelé « Pin de Landes » (Costa, 2005). C'est une espèce bien adaptée aux climats maritimes très tempérés, à température douce et régulière, nécessite une légère humidité, haute niveau de lumière (héliophile)(Kadri *et al.*,2015), supporte la chaleur mais, Il est sensible aux froids prolongés et les fortes gelées. (Alissar, 2006).

Au Portugal, le pin maritime existe depuis préhistoire et trouvé dans toutes les forêts de pins portugais, représente 31% des espèce (figueiral ,1995).

En France, le pin maritime également appelé pin des landes, est implanté dans la région du sud-ouest depuis l'antiquité. (S.Gendrault,2004)

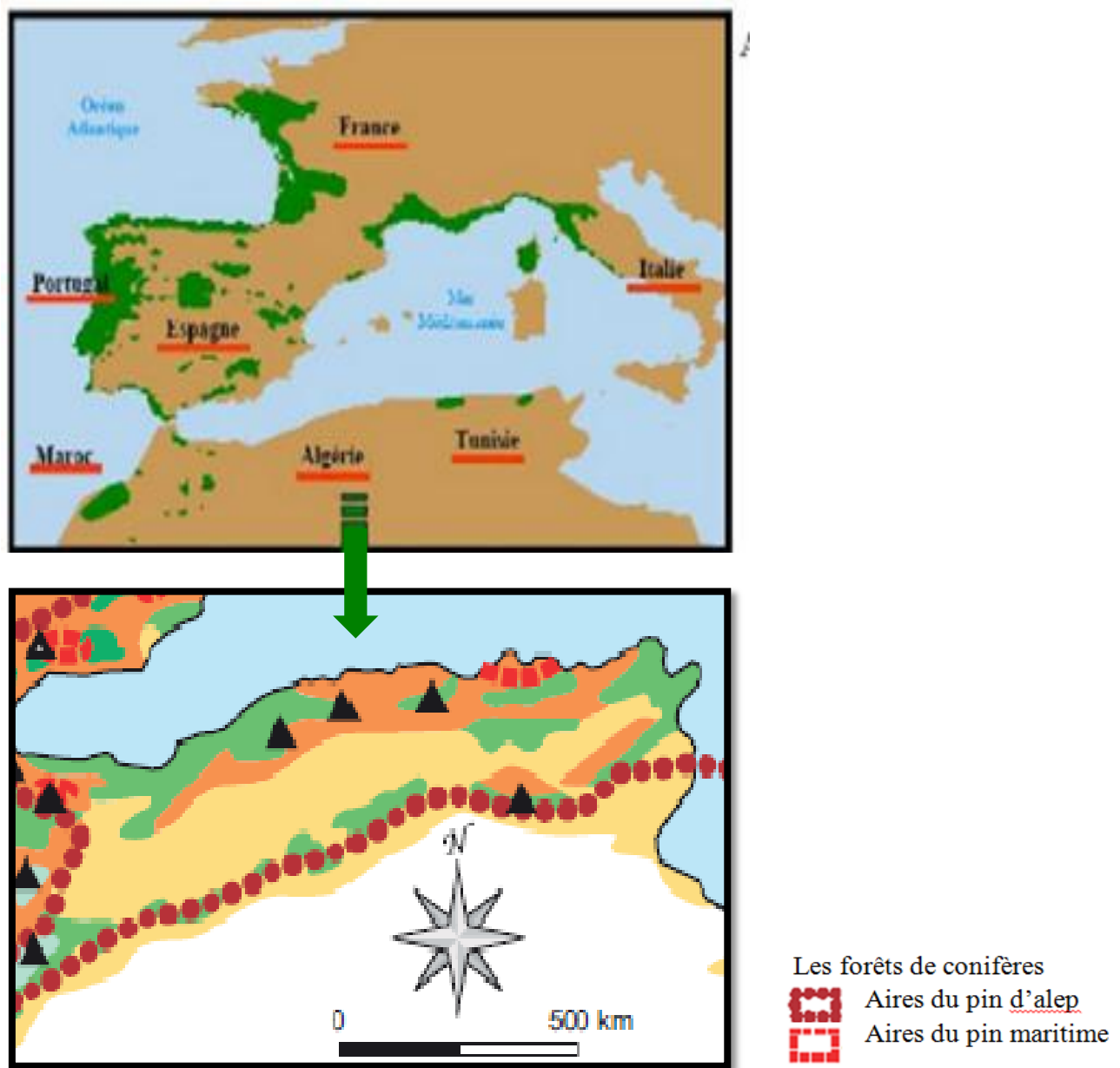


Figure 2: Distribution de *pinus pinaster* en Europe et en Afrique du nord (Bettayeb, 2010 ; LARBI, 2015)

Tableau 1 : répartition de pinus pinaster dans le monde (Alaoui *et al.*, 2011)

Pays		Superficie (ha)	
EN Europe	domaine atlantique et comprend les peuplements	Portugal	1 300 000 ha
		Espagne	1 260 000 ha
		France	1 000 000 ha
	domaine méditerranéen	Sud Est de la France	1 45 000 ha
EN Afrique		au Maroc	14 000 ha
		en Algérie	12 000 ha
		en Tunisie	2 000 ha

II.2. Noms vernaculaires

Nom français	pin maritime
Nom anglais	maritime pine
Nom arabe	الصنوبر البحري

Pinaster : ou "pin sauvage" dans l'Italie latine

Maritime: très adapté à un climat doux et humide. (allissar, 2006)

II.3. Systématique

Selon William Aiton en 1789, le genre *Pinus* de la famille des *Pinaceae*, le plus grand groupe des conifères en nombre d'espèces (plus de 100 espèces), le genre *Pinus* est placé dans la sous classe Pinatae dans la subdivision Coniferophytina des Gymnospermes (Alya *et al.*,

2011). La position systématique du pin maritime (*Pinus pinaster Ait.*) dans la classification actuelle est la suivante (Meullemiestre, 2014).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionata
Embranchement	Pinophyta ou conifère
Sous-embranchement	Gymnosperme
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Pinaceae
Sous-Famille	Pinoideae
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinaster</i>

Nom binominal :

Pinus pinaster

Aiton, 1789

Synonymes :

✚ *Pinus maritima*

✚ *Pinus mesogeensis*

II.4. Présentation et description botanique

❖ Le pin maritime est une espèce sempervirente (toujours verte), à longévité moyenne (un siècle 40-50 ans).

❖ C'est une espèce monoïque (il possède des fleurs mâles et femelles sur le même arbre (alissar, 2006)

❖ Taille :

Hauteurs 30m et plus

Largeur 10m (Jean, Marie polese. 2006)



Figure 3: Photographie de pin maritime (celhay, 2013)

❖ **Graine :**

Ovales, aplaties, sont longues de 5 à 10 mm, noires. (Chagne, 2004)

❖ **Ecorce :**

Grise puis brun-roux et lisse, mais devenant rapidement épaisse et fissurée. (Alissar, 2006)

❖ **Aiguilles :**

Vert –gris sont rigide, pointues et un peu piquantes, elles apparaissent par paires saillant vers l'avant sur les rameaux.

❖ **Cônes :**

Brun luisant, sont de forme allongée lorsqu'ils sont fermés, conique, portent de fines écailles pointues

❖ **Feuille :**

Jusqu'à 20 cm de long, rigides, peu dense, irrégulier regroupés en fascicules de deux aiguilles (Allen, 2004)

❖ **Fleurs:**

Males en chatons ovoïdes allongés, jaunes, en masse compacte,
Femelles en petit chatons rougeâtres, groupées par 2 ou 3

❖ **Floraison:**

Au début de l'été (avril/mai) (Jean, Marie polese, 2006)

❖ **Croissance initiale :** rapide

❖ **Sol :** sableux, pauvre et acide (Alissar, 2006)



Figure 4 : Photographie d'écorce de pin maritime



Figure 5 : Photographie montre les aiguilles et les Cônes de pin maritime de pin maritime (Alaoui et al 2011)

II.5.Métabolites de la plante

II.5.1. Les métabolites secondaires

Chimiquement, la famille des *Pinaceae*, dont les pins font partie, est surtout caractérisée par la présence de résines, de tanins, de terpènes, de lignans et de quelques stilbènes (LaFever *et al.*, 1994).

II.5.1.1. Les composés phénoliques ou Les polyphénols :

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés dans le règne végétal qui sont regroupés en 8000 composés (Celhay, 2013), leur structure possède au moins un cycle aromatique à 6 carbones, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (OH) (T. Hennebelle *et al.*, 2004), présentent plusieurs effets biologiques, notamment antibactériens par inactivation des enzymes hydrolytiques comme les protéases et les carbohydrases, antiviraux, anti-inflammatoires (Metrouh-Amir *et al.*, 2015).

La désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques

Les composés phénoliques sont des substances présentes dans tous les végétaux et dans tous les organes de la plante, Regroupent en divers classes :

Les phénols simples, les acides phénoliques, les coumarines, les flavonoïdes, les stilbènes, les tannins issus de la polymérisation des flavonoïdes, les lignines, les lignanes, qui avec les isoflavones, sont nommées phyto-œstrogènes. (Edeas, 2007).

Les polyphénols de divers aliments et herbes possèdent nombreux avantages pour la santé humaine et certains extraits de plantes riches en polyphénols ont été ajoutés aux suppléments alimentaires grâce à leur activité antibactérienne qui a été évaluée dans plusieurs études pharmaceutiques (Taguri *et al.*, 2006).

II. 5.1.1.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes, comprenant au moins 6000 molécules, répartissent en plusieurs classes (flavonones, flavonols, flavononols,...)

Les flavonoïdes et autres végétaux phénoliques, tels que les acides phénoliques, les stilbènes et les tanins sont importants dans les plantes pour le développement normal de la croissance et la défense contre l'infection et les blessures. (Jerez *et al.*, 2007).

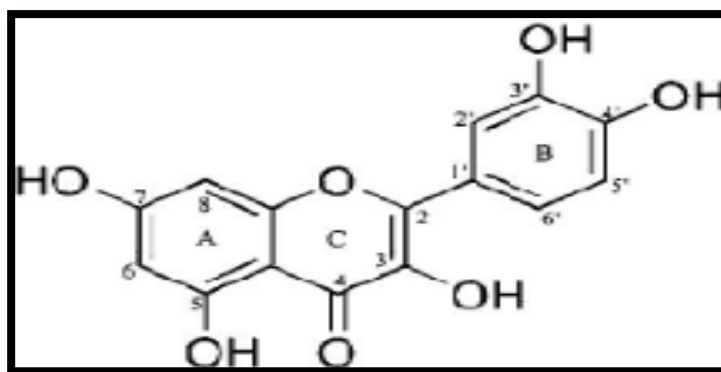


Figure 6: Structure générale du noyau des flavonoïdes

II. 5.1.1.2. Les tanins :

Sont des oligomères de deux à sept unités de flavan-3-ol (Simard, 2007), qui diffèrent des autres composés phénoliques naturels par leur capacité à précipiter les protéines, répartis en deux groupes selon leurs structures : les proanthocyanidines (tanins condensées), et des tanins hydrolysables.

On peut les trouver dans les racines, bois, feuilles, écorces ou fruits, utilisés comme agents antimicrobiens (Scalbert, 1991)

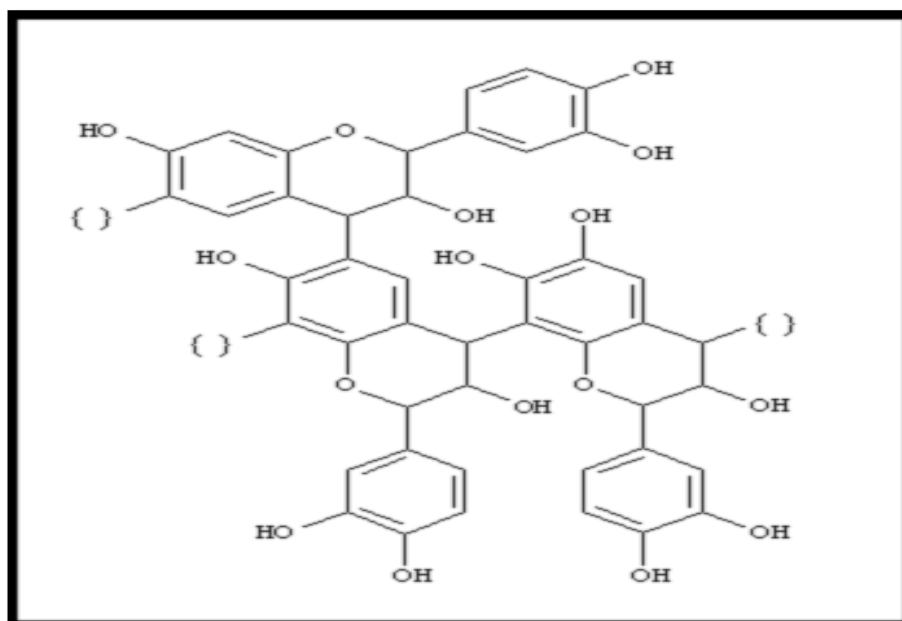


Figure 7: montre la Structure des tanins condensés (Kahlouche-Riachi, 2014)

II. 5.1.1.3. Les coumarines :

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone, Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles (Kahlouche-Riachi, 2014)

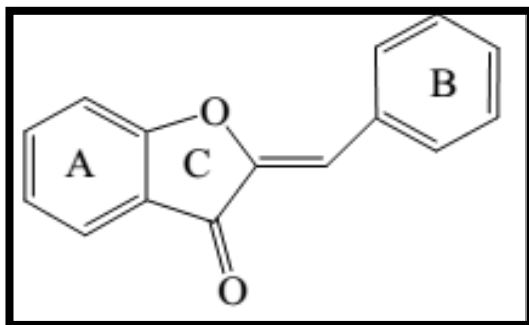


Figure 8: montre la Structure des Coumarines (Safidine, 2015)

II.5.1.2. Les saponines

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

II.5.1.3. Les terpènes

Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 , forment une classe d'hydrocarbures, produits par les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine, possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes...

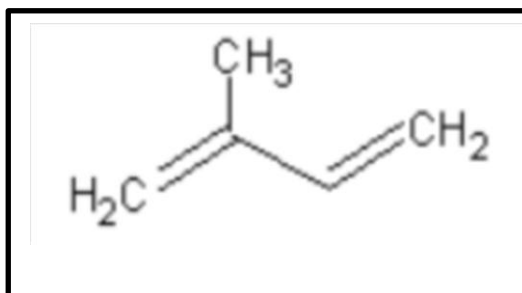


Figure 9: Formule chimique d'isoprène (Safidine, 2015)

II.5.1.4. Les stérols

Les stérols sont des molécules lipidiques possédant une structure tétracyclique (4 cycles), un groupement hydroxyle sur le troisième carbone et une chaîne aliphatique sur le 17ième carbone. Les stérols présents dans les plantes, les champignons et les algues.

Plusieurs études ont démontré que les phytostérols (stérol de plantes) et les phytostanols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle.

Ces différents types de stérols, sont des constituants de membranes cellulaires qui jouent un rôle très important dans la perméabilité de celles-ci et aussi dans la prolifération cellulaire

II.5.1.5. Les alcaloïdes

Les composés azotés se divisent en deux groupes: les acides aminés et les alcaloïdes.

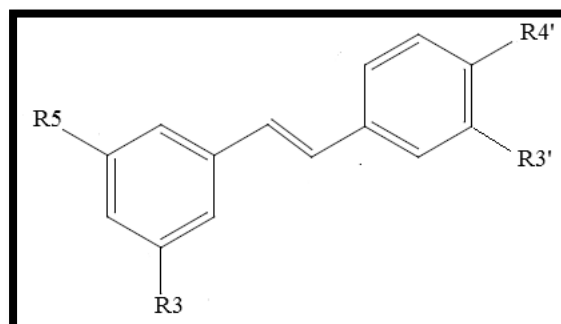
Les alcaloïdes sont des substances organiques naturels hétérocycliques d'origine végétale, avec un atome d'azote.

Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine). La morphine a été le premier alcaloïde isolé dans l'opium (vers 1805). Puis on découvrit la strychnine (1818). (Kahlouche-riachi, 2014)

Ils constituent un des groupes de métabolites secondaires contenant plus de 10000 à 12000 structures différentes (Stöckigt *et al.*, 2002).

II.5.1.6. Les stilbènes

Sont des composés à très petite quantité dans notre alimentation. Le plus connu d'entre eux est le resveratrol, qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses.



R3=R5=R4'=OH, R3'=H Trans resvératrol

R3=R5, R3'=H Pinosylvine

R3=R5=R3'=R4'=OH Picéatannol

Figure 10. Structure des stilbènes
(safidine, 2015)

II.5.1.7. Les résines et les baumes

La résine des pins est un mélange complexe de terpènes constitué d'une partie volatile appelée térébenthine et d'une partie non volatile appelée colophane (rosin).

Les résines peuvent se classer en deux catégories : les dérivés d'esters de colophane et des polymères issus de la chimie pétrolière. La colophane était extraite par les conifères (pin), utilisées dans les encres d'imprimerie sous forme dimérisée ou polymérisée.

Les baumes sont des substances naturelles résineuses odoriférantes riches en huiles essentielles. Par exemple, baumes du Pérou, du Tolu, joue le rôle d'antiseptiques, cicatrisants et d'expectorants (Meullemiestre, 2014).

II.6.Utilisation thérapeutique:

II.6.1.Activité anti-oxydante et antifongique de *pinus pinaster* :

Les extraits d'écorces de pin maritime, contiennent de fortes teneurs en flavonoïdes et en proanthocyanidines. Ces extraits, jouent un rôle d'antioxydant,(celhay, 2013).

Des laboratoires pharmaceutiques ont été utilisé l'extrait d'écorce de pin comme produits cosmétiques contenant des polyphénols aux propriétés antioxydants et anti-inflammatoire, pour la lutte contre la production de radicaux libres néfastes à la santé et à la beauté de la peau. (Edeas , 2007).

L'exposition des plantes aux facteurs de stress abiotiques et biotiques augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) provoquant le stress oxydative. Pour se protéger contre les dommages oxydatifs, les plantes ont un système antioxydant qui contrôle Production de ROS pendant le stress.

La maladie du chancre du pin est causée par *Fusarium circinatum*, un champignon envahissant en Europe avec une grande virulence sur plusieurs Espèces de *Pinus*. Depuis 2003, Des grands efforts sont en cours pour contrôler la maladie et réduire ses effets destructeurs, avec la sélection d'espèces résistantes, et les clones de *P. pinaster*. (vivas *et al.*, 2014).

II.6.2.Activité antidiabétique et anti-inflammatoires de pin maritime :

L'utilisation de sous-produits industriels tels que le bois s'inscrit dans une démarche de développement durable et de valorisation et transformation des déchets en charbon actif.

Maintenant, l'écorce de pin a été utilisée de nombreuses conditions, pour le scorbut causé par la Carence en vitamine C, considérée comme utile pour la cicatrisation dans le cas des affections cutanées.

Hippocrate, le « Père de la Médecine » mentionnait les effets Thérapeutiques de l'extrait d'écorce de pin maritime sur le diabète et les maladies inflammatoires. (paker et al. 1999)

Dans une étude réalisée sur des rats diabétiques montrer que le traitement par l'extrait de l'écorce de pin (PBE) inhibe la formation de cataracte chez les diabétiques, le PBE considéré aussi comme un remède et traitement antihyperglycémique , le PBE n'a aucun effet sur la sécrétion d'insuline, mais il inhibe la synthèse d'alpha-glucosidase (enzyme intestinal impliquée dans la digestion des glucides) grâce à procyanidines (flavonoïdes). (Alya *et al.*,2011).

II.6.3.Les effets pharmaceutiques et nutraceutiques de l'extrait d'écorce de *Pinus pinaster*

Le Pycnogenol® est un extrait d'écorce du pin maritime français, *Pinus pinaster Ait.*, Se compose de plusieurs polyphénols hydrosolubles,tel que la catéchine, taxifoline et des acides phénolcarbones, possède une activité veinante et relaxante et la capacité d'améliorer la microcirculation en augmentant la perméabilité capillaire.(jerez *et al.*,2007),et composé aussi des bioflavonoïdes qui améliorent l'oxyde nitrique endothélial (NO) synthase et inhibe sa dégradation (Nishioka *et al.*,2007).

Le Pycnogenol® utilisé comme un agent antimicrobien contre différents microorganismes procaryotes pathogènes (gram+ et -) et eucaryotes tels que les levures et les champignons, et. (Torras *et al.*,2005) comme remède à base de plantes nutrition et comme complément alimentaire dans de nombreuses maladies dégénératives, avait des effets cardio-vasculaires et hypocholestérolémiant, accélère les processus de cicatrisation, diminue la libération d'histamine par les mastocytes et inhibe les actions pro-inflammatoires des cytokines

(Iravani *et al.*, 2011).

le PYC est efficace dans le traitement de l'insuffisance veineuse chronique et des micro-hémorragies rétinienne et protège contre le stress oxydatif dans plusieurs systèmes cellulaires et empêche l'agrégation plaquettaire induite par le tabagisme et réduit la concentration de

thromboxane (Rohdewald et al.2002) . Aussi, il assure une protection contre l'érythème provoqué par les rayons UV après la prise orale de ce médicament (Saliou *et al.*, 2001)

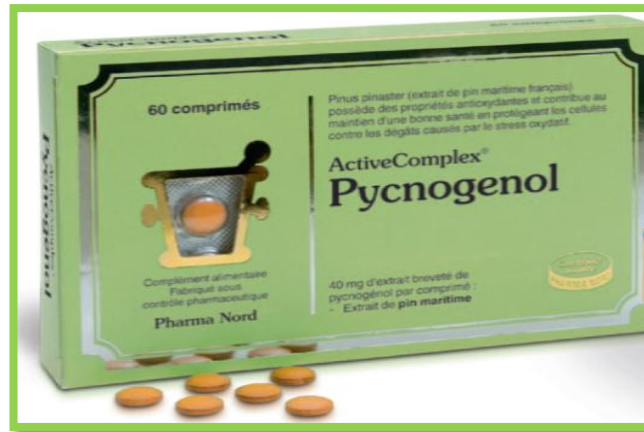


Figure 11: Le Pycnogenol

La recherche de nouveaux agents antimicrobiens pour le traitement des infections bactériennes était pour évaluer la capacité des extraits des plantes d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes.

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Microbiologie alimentaire du département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques de l'Université D'Akli Mohand Oulhadj à Bouira.

Notre travail expérimental a porté sur l'identification des composants chimiques qui peuvent être responsables des propriétés antimicrobiennes de différents extraits (hydroéthanolique, éthanolique, aqueux) de *pinus pinaster*, et d'évaluer l'activité antibactérienne de ces extraits sur trois souches bactériennes dont le but de déterminer l'extrait le plus efficace.

I.1. Matériel :

I.1.1. Matériel végétal

Les écorces de pin maritime (*pinus pinaster*) ont été récoltées dans la wilaya de Jijel, les écorces de pin maritime sont séchées à l'aire libre dans le laboratoire pendant une semaine

La nature et l'origine des extraits utilisées sont indiquées dans le tableau 02

Tableau 02: Nature et origine du matériel biologique utilisé

	Nature	Origine
Extraits	Extrait hydroéthanolique Extrait éthanolique Extrait aqueux	Les extraits végétaux ont été préparés dans le laboratoire de Microbiologie alimentaire du département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques de l'Université D'Akli Mohand Oulhadj à Bouira Ces extraits ont été stockés à +4°C à l'obscurité.

I.1.2. Matériel microbiologique :

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits de la plante étudiée, trois souches bactériennes isolées cliniquement dans le laboratoire d'analyse médical de bouira.

Les souches bactériennes utilisées pour l'étude du pouvoir antibactérien de *pinus pinaster*, sont : *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*.

Tableau 3: Souches bactériennes testées (safidine, 2015)

Famille	Souches	Gram	Caractéristiques
Micrococcaceae	<i>staphylococcus aureus</i>	+	Cocci ubiquitaire, commensal de l'homme, Responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients.
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	-	Bacille aérobie, on le trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud.
Streptococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	C'est une bactérie anaérobie facultative, qui habite le tube digestif des humains et d'autres mammifères. Elle cause des infections mortelles chez l'homme.

I.2. Méthodes :**I.2.1. Préparation des extraits**

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

Les extraits préparés sont: extrait aqueux; extrait hydro-alcoolique (eaux éthanol), l'extrait alcoolique.

I-2-1-1- préparation de l'extrait aqueux :

Cette extraction a été réalisée selon la méthode décrite par BOLOU et *al.* (2011) avec quelques modifications :

- ❖ 7g de poudre d'écorce de pin maritime, 70ml de l'eau distille
- ❖ macération à température ambiante pendant 72h, avec une agitation, pendant 24h;
- ❖ Après extraction l'extrait est filtré;
- ❖ le filtrat récupéré est séché à sec. La poudre obtenue est le macéré aqueux ou extrait total aqueux (ETA).

I-2-1-2- préparation de l'extrait alcoolique par macération dans l'éthanol 70%.

La préparation de cet extrait se fait selon la méthode décrite par BOLOU et *al.* (2011) avec quelques modifications :

- ❖ 10g de poudre d'écorce pin maritime, sont agités dans 150 ml d'éthanol 70 % pendant 24h,
- ❖ Filtration sur papier filtre et séché à l'étuve à 40°C.
- ❖ La poudre obtenue est l'extrait éthanolique 70 % (EE 70%).



Figure 12: photographie de l'étuve à ventilation

I-2-1-3- préparation de l'extrait hydro éthanolique :

La préparation de cet extrait se fait selon la méthode décrite par Biyiti *et al.* (2004) avec quelques modifications :

- ❖ macération (48 heures) de 5g de matériel végétal pulvérisé dans 50ml de mélange éthanol-eau V/V (40/10) sous une agitation pendant 24h.
- ❖ Les filtrats obtenus sur papier filtre sont séchés à l'étuve (40°C).
- ❖ Les résidus obtenus sont conservés à 4°C avant la réalisation des tests antibactériens

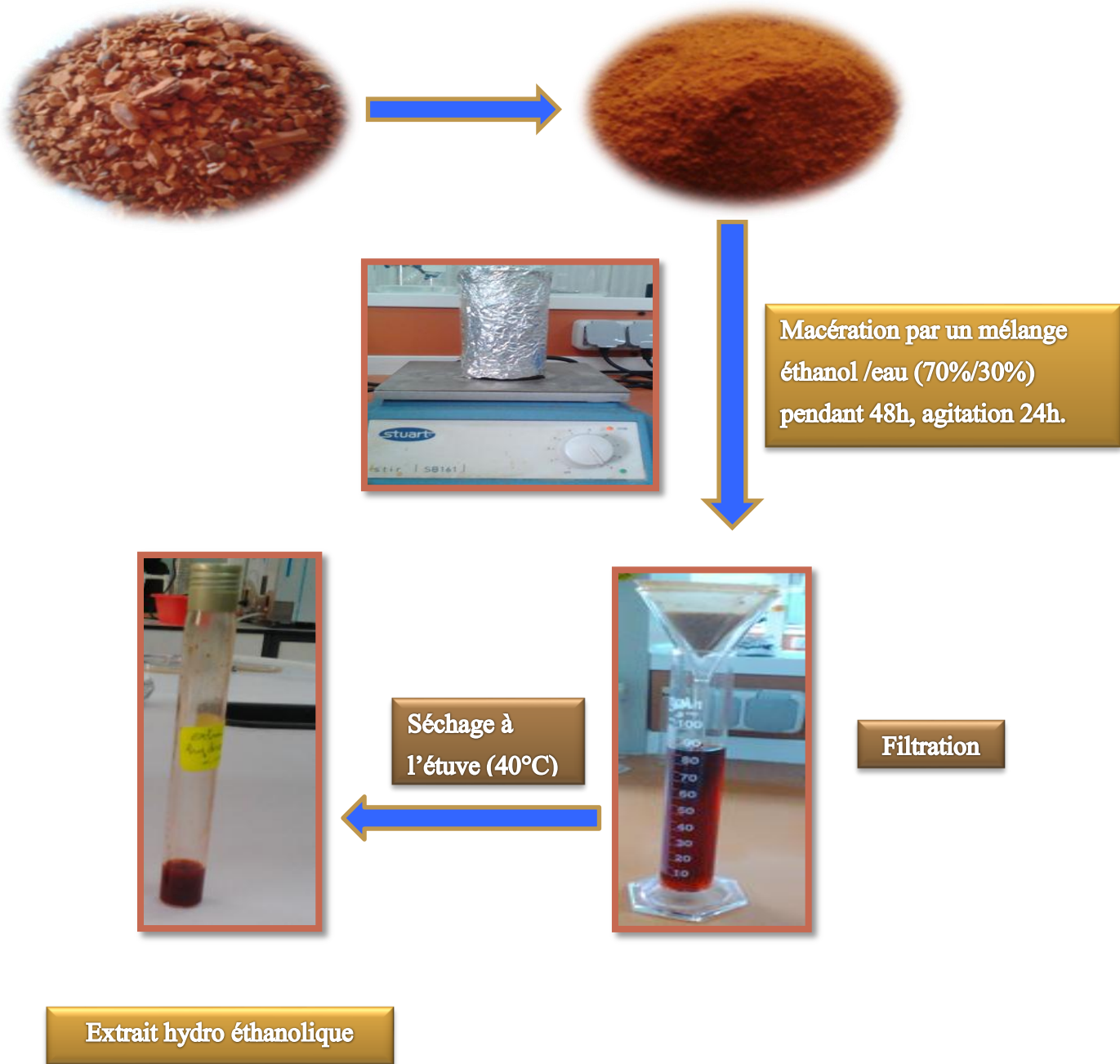


Figure 13: Extraction des substances végétales

Calcul du rendement

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

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

(%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

I-2-2-Evaluation de l'activité antibactérienne :

L'inhibition de la croissance bactérienne in vitro a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide (Basli *et al.*,2012)

Selon Biyiti *et al.*, (2004), un extrait est considéré comme actif s'il produit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm, lorsque la zone d'inhibition est supérieure à 5 mm, la plupart des extraits végétaux exercent une activité antibactérienne contre *E. coli*, *S. aureus* (Jouda *et al.*, 2016).

Une zone d'inhibition supérieure à 14 mm correspond à une activité antibactérienne très significative (Ramzi *et al.*,2010).

La sensibilité des souches bactérienne ,vis-vis des antibiotiques ont été utilisées comme contrôle positif et de l'eau distillée stérile et l'éthanol comme contrôle négatif.

Les antibiotiques couramment utilisés pour tester les organismes Gram-positifs et négatifs sont : pénicilline, streptomycine, ampicilline,... (Bauer *et al.*, 1966)

I.2.2.1.Préparation des extraits aqueux :

1g de la poudre végétale additionnés de 10ml d'eau distillée, ont été mis en agitation par le vortex jusqu'à la dissolution totale des extraits de la plante (*pinus pinaster*) pour une concentration de 0.1g/ml (100mg/ml), après la préparation des extraits, une gamme de dilution a été établie.

I.2.2.2.Préparation de milieux de culture :

La sensibilité des souches aux extraits de plantes a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé, nous avons utilisé Mueller Hinton comme milieu de culture.

I.2.2.3. Préparation de l'inoculum :

Les différentes souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur gélose nutritif, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. A partir de ces cultures jeunes, des colonies pures sont isolées pour préparer l'inoculum bactérien. Chaque colonie est mise en suspension dans 9 ml eau physiologie. La turbidité de la suspension est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre et ajustée à 0,5 Mc Farland (soit 108ufc/ml) et ramené à 107 ufc/ml dans du bouillon Mueller-Hinton, puis ensemencée à la surface par écouvillonnage en effectuant des stries serrées. (Bolou *et al.* (2011).

I.2.2.4. Technique de diffusion en puits :

Les méthodes de diffusion utilisées pour étudier l'activité antibactérienne des substances naturelles des extraits de plantes. Ces tests sont basés sur l'utilisation des disques ou des trous contenant les solutions de substances à examiner (Rauaha *et al.*2000).

Après l'ensemencement de l'inoculum, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés.

Les puits sont ensuite remplis par 20 µl de l'extrait (100mg/ml) à tester. Après 30 min de diffusion à la température du laboratoire, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24h. À la fin de la période d'incubation l'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant les zones d'inhibition autour des puits, les diamètres des zones d'inhibition formés autour des puits ont été mesurés en millimètre. (Barchan *et al.*,2016).

I.2.2.5. L'antibiogramme :

L'intérêt de ce test est d'étudier et de comparer l'effet d'inhibition des polyphénols sur les souches utilisées. Il s'agit de trois antibiotiques «pénicilline» et la «céphaloxine»,Ampécilline. il a été mis en culture par la même méthode de diffusion sur gélose.

I.2.3. Détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose :

Les extraits ayant montré une activité antibactérienne positive, sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de diffusion sur gélose.

La CMI de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures (Basli *et al.*, 2012). Des dilutions successives ont été préparées (1/2, 1/4,1/8, 1/16 et 1/32).

II.1. Extraction :

La préparation des extraits à partir de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) été effectuée en trois méthodes, Extraction par un mélange hydroalcoolique éthanol/eau (7/3 V/V), extraction par l'éthanol et une extraction aqueux ; pour obtenir initialement l'extrait brut contenant les polyphénols totaux.

II.1.1.Rendement des extraits :

L'éthanol et leurs mélanges avec l'eau sont les plus largement utilisés pour l'extraction des polyphénols à partir de plantes en raison de leur rendement élevé et leur avantage de moduler la polarité du solvant.

Il existe un équilibre entre la polarité et le rendement d'extraction polyphénolique : le solvant moins polaire, rendant le rendement d'extraction faible, alors que l'éthanol, qui était légèrement plus polaire, était le meilleur solvant d'extraction (Franco *et al.*,2008).

Dans notre travail, le meilleur rendement d'extraction enregistré par la macération hydro-éthanolique, qui soit une moyenne de 26.8%, suivi par l'éthanol 19.1% ; tandis que le rendement le plus faible a été obtenu avec de l'eau 15.2%. Ces résultats indiquent que la plante contient plus de substances polaires que les autres; donc, la différence dans les taux d'extraction des extraits est liée aux polarités de divers composés présents chez *P. maritime*.

La solubilité des composés phénoliques est influencée par la nature du solvant utilisé et leur polarité (Naczk et Shahidi, 2004), Hayouni *et al*(2007) ont constaté que le taux d'extraction, la teneur totale en polyphénols et l'activité antibactérienne dépendent considérablement de la méthode d'extraction et de la nature du solvant.

II.2. Les principaux constituants de la plante :

Les flavonoïdes sont des polyphénols d'origine végétale possèdent des propriétés antioxydant permet le piégeage direct des radicaux libres (Tourino et al.2005), anti-inflammatoires, hépatoprotectrice, antithrombotique, antivirale, (Edeas et al 2007), antimicrobiens (Sousa et al., 2009), antiprolifératif, (Tourino et al.2005), antibactérienne contre différents types de bactéries : *staphylococcus aureus*, *escherichia coli*.

L'action pharmacologique des flavonoïdes pourraient présenter un intérêt dans le traitement des allergies car ils sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. (Kahlouche-riachi, 2014)

Un chercheur travaillait sur bioflavonoïdes trouver que les bioflavonoïdes pourraient être utilisés dans le traitement du scorbut. Plus tard, il a déterminé que l'extrait d'écorce de pin était riche en bioflavonoïdes, y compris les acides organiques (Alya et al.2011).

Les bioflavonoïdes extrait de pin, ont un effet sur la formation des radicaux libres dans les lignées cellulaires de macrophages murins, telles que l'activité de piégeage contre les espèces réactives de l'oxygène (Pinelo et al.2004).

l'écorce de pin (*pinus pinaster*) composé principalement du résorcinol anneaux (Taguri et al 2006), et des oligomères de procyanidine (Tourino et al.2005) qui sont des oligomères et polymères de catéchine, d'épicatéchine et leurs esters d'acide gallique liés par des liaisons c4-c6 ou c4-c8) (procyanidines de type b), qu'ont été extraits avec de l'éthanol, et des prodelphinidines (jerez et al. 2009).

Les proanthocyanidines sont connues sous le nom de proanthocyanidines oligomères ou de tanins condensés, constitués d'oligomères de deux à sept unités de flavan-3-ols (Romani *et al*, 2006), comprennent les procyanidines, les prodelphinidines et les propelargonidines. (Iravani et al 2011). Ces derniers ont divers activités physiologiques telles qu'antioxydant, antiprolifératifs, anti-inflammatoires (tourino et al.2005), antimicrobien, antiallergique, anti-hypertenseurs et inhibiteurs de certains enzymes et récepteurs physiologiques. (jerez et al.2009).

Les procyanidines sont des biopolymères de la catéchine et des sous-unités épicatechines, qui sont des constituants importants de la nutrition humaine (Rohdewald et al.2002), impliqués dans la régulation de certaines fonctions cellulaires telle que la regulation de cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (jerez et al.2007).

La rp-hplc (liquide à haute performance en phase inverse chromatographie) est la méthode la plus utilisée pour l'analyse des procyanidines (jerez et al.2009)

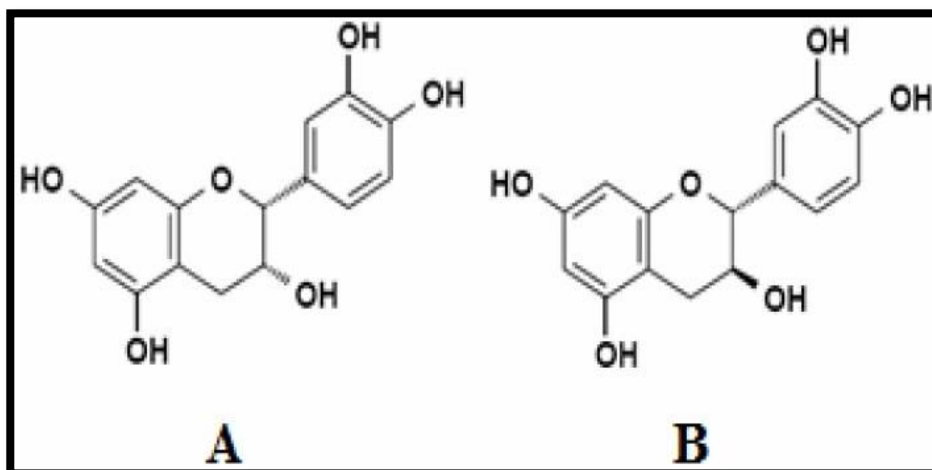


Figure 14: Flavan-3-ols: épicatechine (A) et catéchine (B) (Iravani et al 2011).

Une analyse des empreintes digitales pour l'écorce extrait de *Pinus pinaster* par la méthode de HPLC permet d'identifier quatre composantes de l'extrait: acide cafféique, catéchine, acide ferulique et taxifoline. (Alya et al.2011).

II.3.1'activité antibactérienne :

Il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Mais, la consommation à grande échelle de ces « médicaments » a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouveaux substituts, surtout les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration dans les recherches médicales (Ali-Shtayeh et al. 1998).

La présente étude a révélé la présence importante de composés phénoliques dans les extraits de *p. maritime*. La présence de ces métabolites révèle son activité contre les bactéries pathogènes (Muanda et al., 2010). Notre étude est en accord avec des études antérieures qui indiquent l'activité antibactérienne de la plante contre les organismes Gram positif et Gram négatif (Kahlouche-riachi, 2014).

II.3.1. Activité antibactérienne des extraits d'écorce de *pinus pinaster*:

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

Tableau 04 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*.

extraits végétaux	Diamètre d'inhibition (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Extrait aqueux	14	12	14
extrait hydroéthanolique	16	15	17
extrait éthanolique	15	13	16
L'eau	0	0	0
L'éthanol	0	0	0

Tableau 05 : Effet inhibiteur des Antibiotiques sur la culture de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*

Antibiotiques	Diamètre d'inhibition (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Pénicilline	30	30	8
Cephalexin	0	8	0
Ampéciline	0	0	0

D'après ces résultats, on peut dire que, les souches, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ont été sensibles pour la pénicilline et pour la souche *Enterococcus faecalis*, été peu sensible pour cette antibiotique ; par contre, pour la cephalexine, *Escherichia coli* été peu sensible, et les deux autres souches *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* ont été résistant(Figure16).

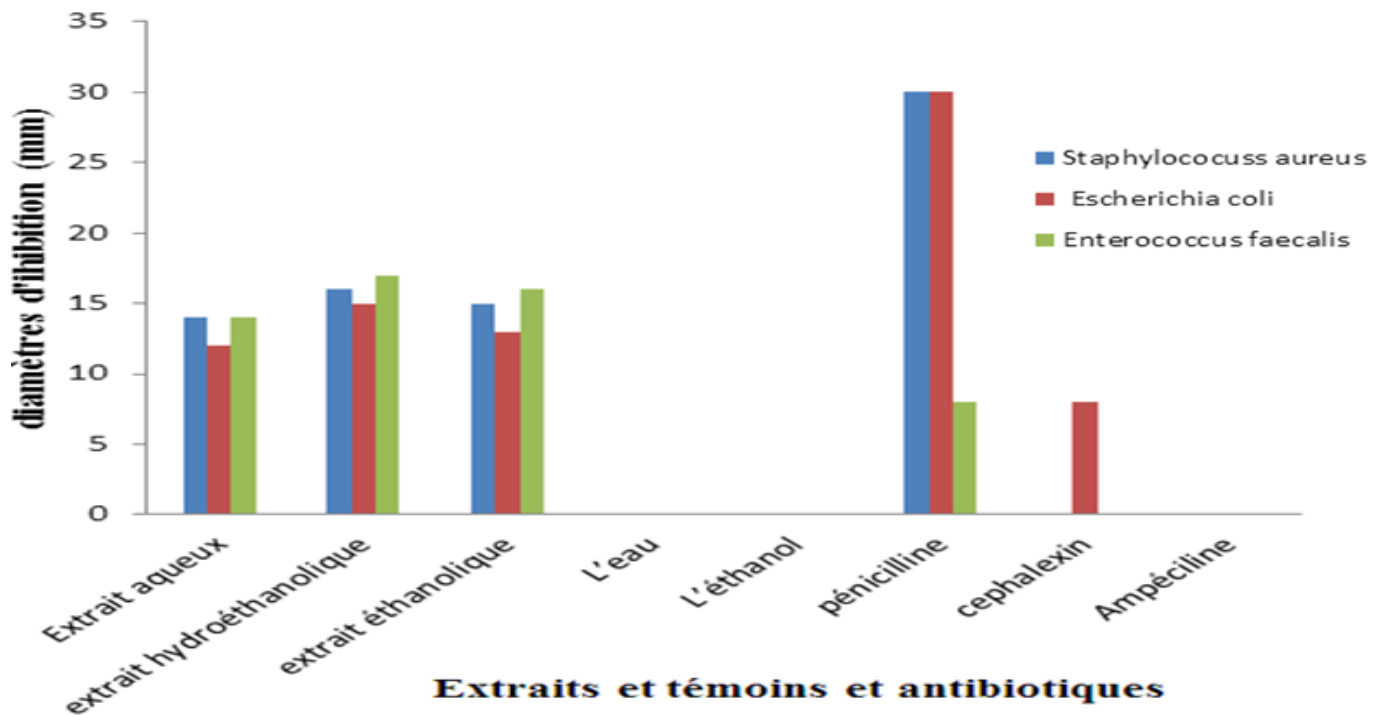


Figure 15: Activité antibactérienne des extraits végétaux par rapport aux antibiotiques

A la concentration de 100mg/ml les extraits végétaux (aqueux, hydroéthanolique et éthanolique) de PP, ont un effet significatif sur la souche *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et similaire à la pénicilline, par contre, l'ampécilline n'exerce aucun effet contre les trois souches, donc les souches bactérienne résiste à ce antibiotique; pour la céphalexine, la souche *Escherichia coli* est peu sensible, mais les deux autres souches (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*) ont été résistant à ce antibiotique

La différence d'activité entre ces extraits pourrait s'expliquer par la nature des molécules contenues dans chacun extrait. En effet, il existe des différences de capacité de solubilisation et d'extraction des solvants, à l'égard des phytomolécules. Au cours de l'extraction liquide-liquide, les phytomolécules sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité.

Les résultats ont révélé que L'extrait aqueux d'éthanol a montré les plus grands effets inhibiteurs contre les trois souches avec une zone diamètre d'inhibition de 16 mm sur *S. aureus*, suivi d'*E. faecalis* et *E. coli* avec des zones d'inhibition de 15 et 17 mm, respectivement. Cependant, l'extrait éthanolique a eu une zone diamètre d'inhibition de 15 mm

sur *S. aureus*, suivi d'*E. faecalis* et *E. coli* avec des zones d'inhibition de 13 et 16 mm, respectivement.

Ces plus grandes zones d'inhibition pourraient être dues aux fortes teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes obtenus dans ces extraits.

Les activités antibactériennes les plus faibles observées dans les extraits aqueux pourraient limiter les faibles niveaux de polyphénols et de flavonoïdes de ces extraits. Les zones d'inhibition augmentent avec les teneurs en composés polyphénoliques. Les flavonoïdes, les composés phénoliques, les tanins et les alcaloïdes sont les agents antimicrobiens et les constituants bioactifs les plus importants de la plante (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007). L'effet antibactérien des composés phénoliques pourrait être lié à l'interaction avec les enzymes, l'adsorption sur les membranes cellulaires, le substrat et la privation d'ions métalliques (Scalbert, 1991). Hayek et Ibrahim (2012) ont signalé que la barrière de perméabilité de la structure de la membrane bactérienne pouvait être perturbée par les composés phénoliques de l'extrait. Kahlouche-riachi, 2014, dans leur travail sur *pinus pinaster*, a signalé que la souche *S. aureus* et *E. coli* sont sensibles à l'extrait hydroéthanolique, ce qui est conforme à nos résultats.

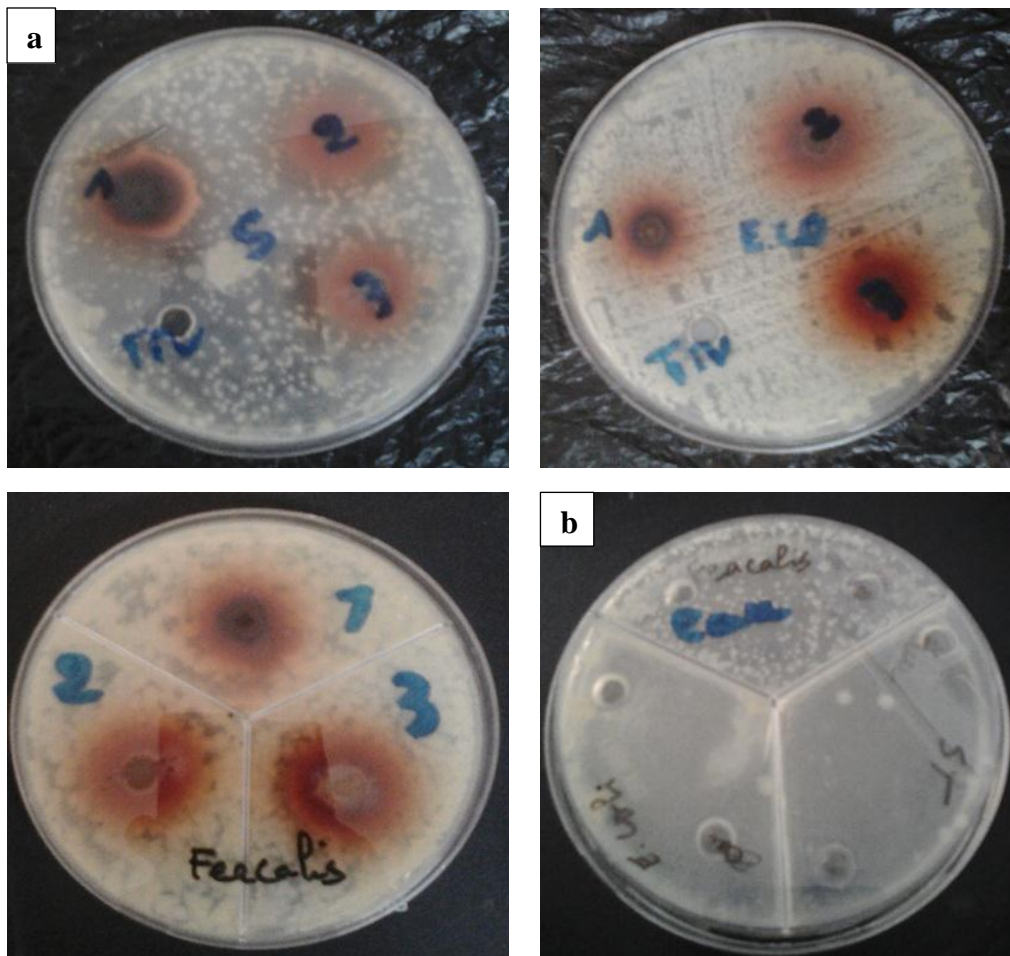


Figure 16:a/ Effet antibactérien des extraits végétaux sur *Staphylococcus aureus* (*S*), *Escherichia coli* (*E.co*) et *Enterococcus faecalis*, **b/**contrôle négatif (1 : Extrait aqueux, 2 : Extrait hydroéthanolique, 3 : Extrait éthanolique)

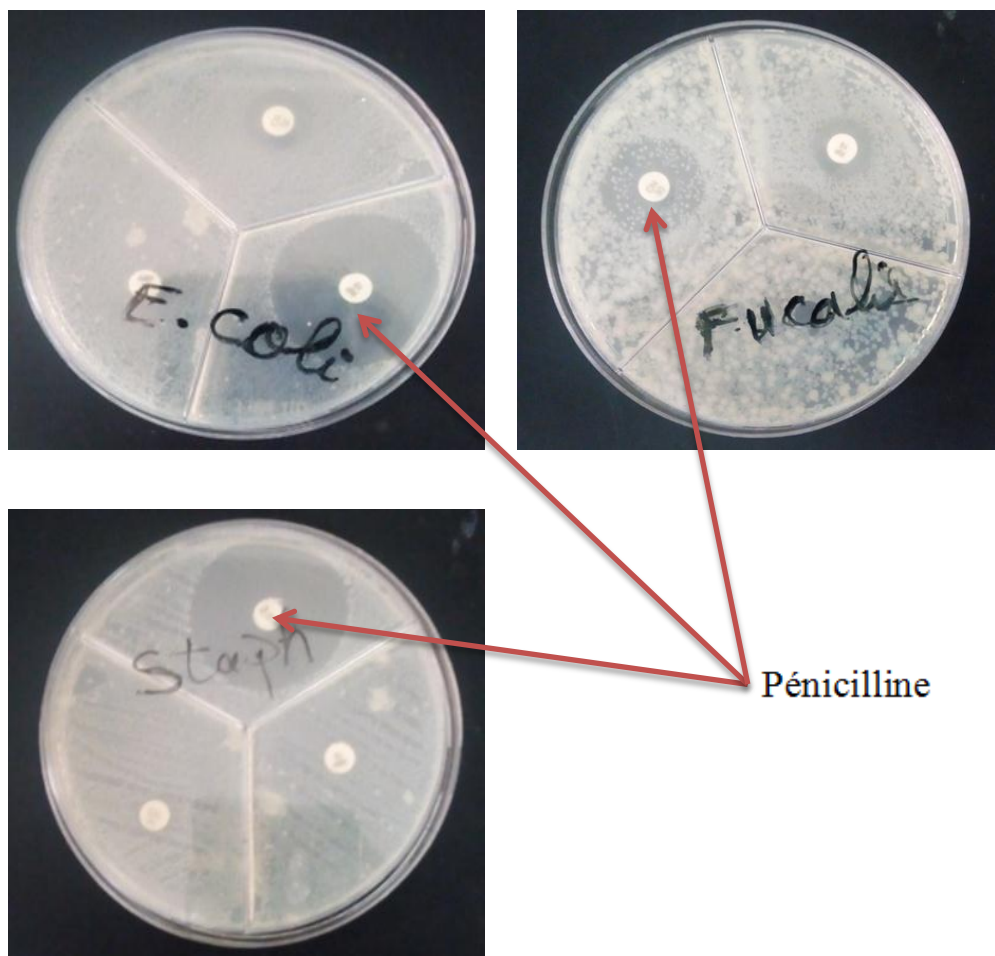


Figure 17: Effet des Antibiotiques : pénicilline et céphaloxine, sur la culture de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*

II.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Les extraits ayant une CMI inférieure à 500 $\mu\text{g/ml}$ sont considérés actifs, l'activité antibactérienne est modérée à des concentrations de CMI comprises entre 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$, et faible au-delà de 1000 $\mu\text{g/ml}$. (Molina-Salinas, 2007 ;Rios et Recio, 2005 ;Toyang, 2012)

II.3.3.1. Activité antibactérienne des extraits sur *Staphylococcus aureus* :

Tableau 06: Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur la culture de *Staphylococcus aureus*

extraits végétaux	Diamètre d'inhibition (mm)						CMI (µg/ml)
	D1	D2	D3	D4	D5	Moyenne	
Extrait aqueux	11	8	6	4	-	7.25	600
extrait hydroéthanolique	14	12	7	6	4	8.6	300
extrait éthanolique	13	9	5	4	-	7.75	600

D 1, 2, 3,4 et 5 : diamètres d'inhibition mesurés

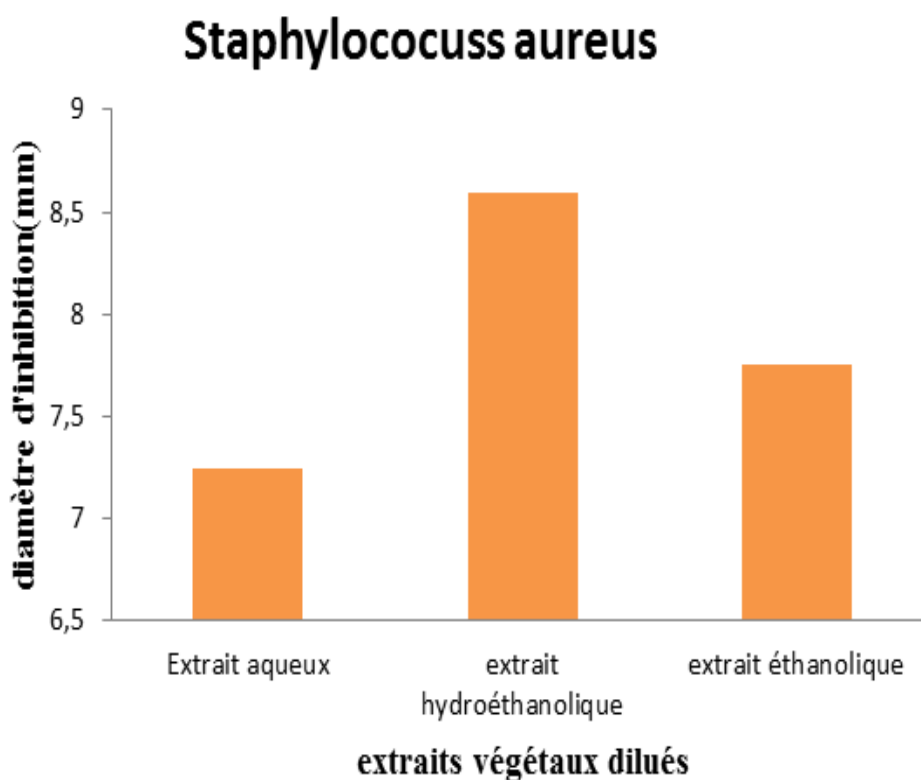


Figure 18 : Effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur la culture de *Staphylococcus aureus*

En présence des extraits (aqueux, hydroéthanolique, éthanolique) dilués de PPI, *Staphylococcus aureus* a développé des diamètres d'inhibition de 7.25 mm, 8.6mm et 7.75 mm respectivement (Figure18).

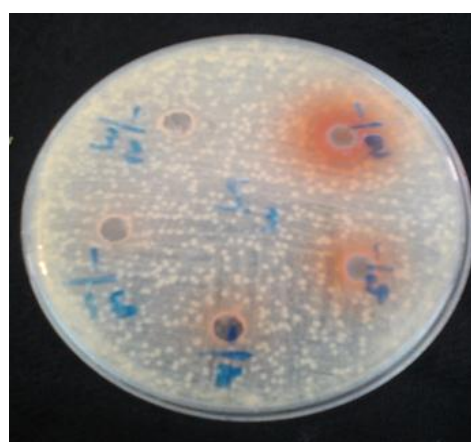


Figure 19: Effet antibactérien des extraits végétaux dilués (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) sur *Staphylococcus aureus* (S),

II.3.3.2. Activité antibactérienne des extraits sur *Escherichia coli* :

Tableau 07: Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits végétaux sur la culture d'*Escherichia coli*.

extraits végétaux	Diamètre d'inhibition (mm)					CMI (µg/ml)
	D1 (mm)	D2 (mm)	D3 (mm)	D4 (mm)	Moyenne	
Extrait aqueux	10	7	5	2	6	600
extrait hydroéthanolique	12	9	5	3	7.25	600
extrait éthanolique	10	8	4	2	6	600

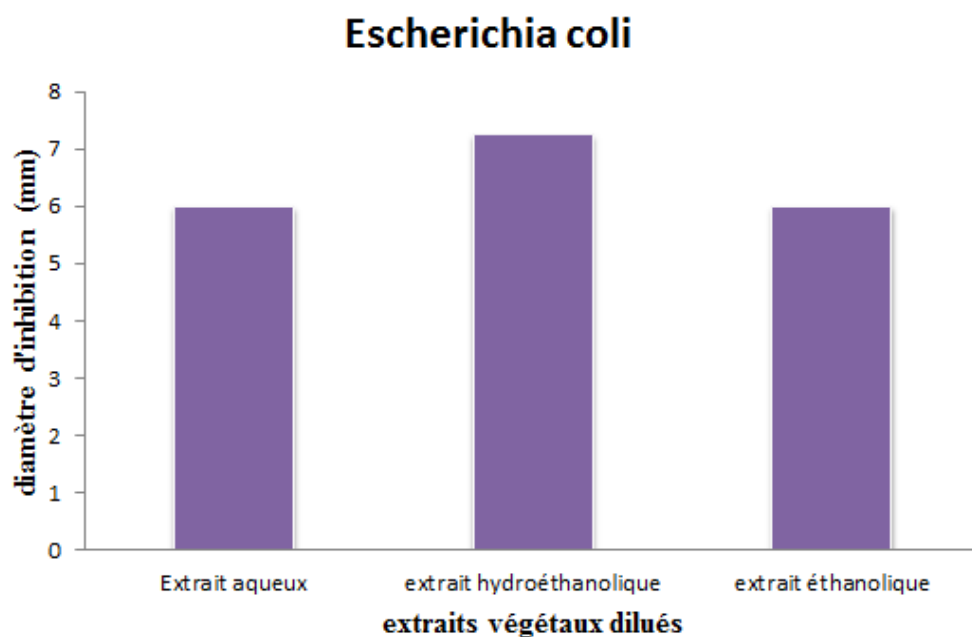


Figure 20: Effet inhibiteur des extraits végétaux dilués sur *Escherichia coli*

En présence des extraits (aqueux, hydroéthanolique, éthanolic) dilués de PPI, *Escherichia coli* a développé des diamètres d'inhibition de 6mm, 7.25 mm, 6mm respectivement (Figure20).

Les diamètres des zones d'inhibition produits par EHE (extrait hydroéthanolique) sont supérieurs à ceux obtenus avec les extraits aqueux et éthanolic (Tableau 6 et 7). Ces résultats analogues ont été obtenus par (Kahlouche-riachi, 2014) qui ont montré que l'extrait hydroalcolique de *pp* inhibe la croissance *in vitro* de diverses souches bactériennes. L'extrait hydroalcolique est alors plus actif et concentrerait mieux les principes actifs antibactériens contenus dans la plante que les autres extraits.

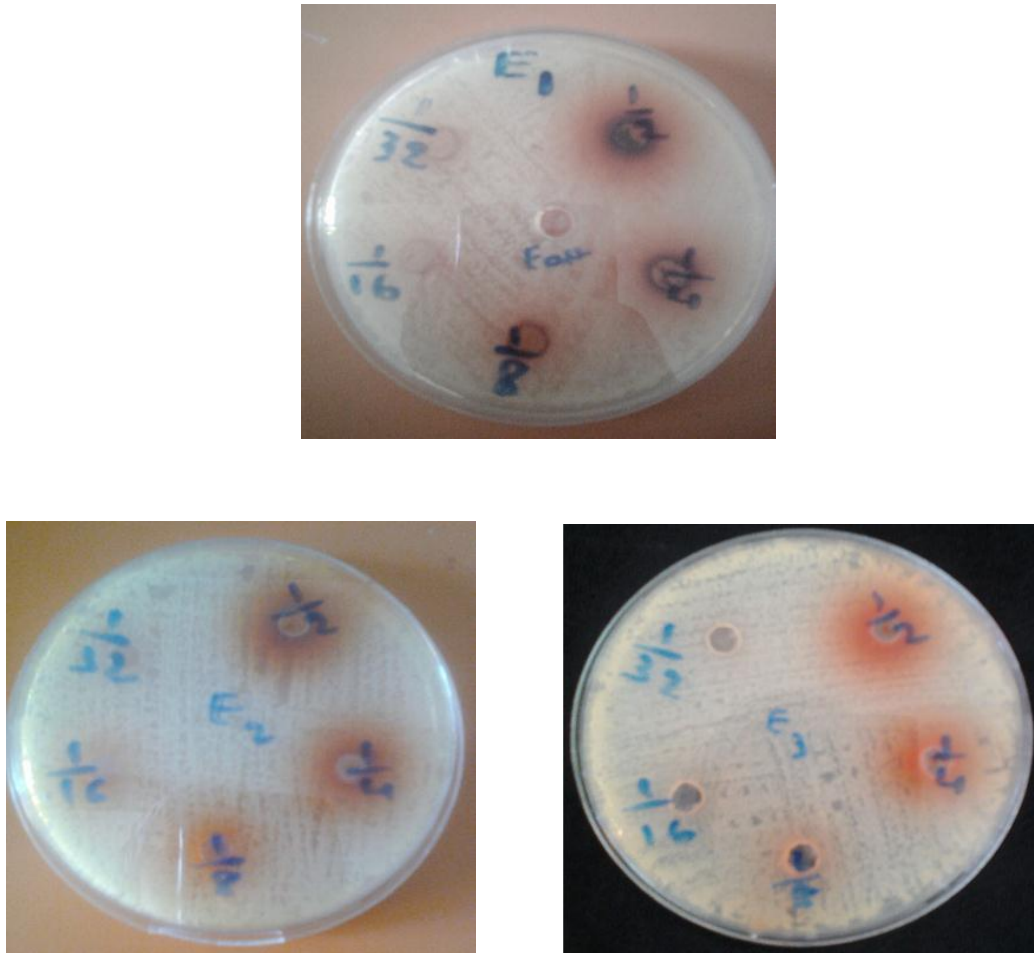


Figure 21: Effet antibactérien des extraits végétaux dilués (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) sur *Escherichia coli* (E).

Les extraits végétaux étudiés étaient principalement exposés contre les bactéries gram-positives et gram-négatives, ils ont été montrés un effet significatif contre les trois types de bactéries.

L'activité antibactérienne la plus élevée a été montrée par l'extrait hydroéthanolique. Par contre les deux autres extraits ont été moins efficaces, ce qui indique que l'éthanol en combinaison avec l'eau permet une meilleure extraction des polyphénols totaux.

L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols. Cette augmentation est peut être due à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène et l'augmentation de la basicité dans les solutions aqueuses.

En ce qui concerne le solvant d'extraction, l'éthanol le meilleurs extracteur des flavonoïdes quel que soit le mode d'extraction.

L'éthanol et l'eau sont préférables pour l'extraction des polyphénols, car ils sont non polluants et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol (mahmoudi et al.2013)

L'éthanol aqueux permet d'extraire des teneurs plus élevées en composés phénoliques que le méthanol absolu et l'éthanol absolu (Sultana et al. 2007). La faible teneur en composés phénoliques dans l'extrait aqueux *pinus pinaster* pourrait être due à la présence d'impuretés (acides organiques, glucides, protéines solubles) qui peuvent interférer dans la détermination des composés phénoliques, Chirinos et al. (2007) ont montré que l'utilisation de l'eau pure comme solvant d'extraction conduit à un extrait avec un pourcentage élevé d'impuretés.

La flore algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle, parmi elles, une plante à fait l'objet de notre étude. Il s'agit de *pinus pinaster*.

Dans ce travail, nous avons utilisé une plante médicinale, « *pinus pinaster* » et son influence sur *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, puis déterminait le CMI des extraits végétal.

A partir des résultats des extraits, nous avons fait ressortir que l'extrait hydroéthanolique de *pinus pinaster* montre un effet important contre les souches de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*.

Références bibliographiques

Afif Chaouche, T., 2015. Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydant de quelques plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou - Algérie

Alaoui, A., Laaribya, S., Gmira, N. 2011. Production, croissance et modèles de conduite sylvicoles des principales essences (le pin maritime et le pin d'Alep) de reboisement au Maroc. Kastamonu Univ., Journal of Forestry Faculty 11(1), 68 – 84

Allen, Coombes. Arbres. Editions Larousse, 2004 ,223. La page utilisé 40

Ali-Shtayeh, M.S., Yaghmour, R. M.-R., Faidi, Y.R., Salem, K., Al-Nuri, M.A. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area .Journal of Ethnopharmacology 60, 265–271

Alissar, C., 2006. Effets de la limitation croisée en phosphore et en lumière sur la croissance et la morphogenèse aérienne et racinaire de jeunes plants de pin maritime.

Alya, M., Ismat, N., Zeb S., Khalid, J. 2011. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. Journal of Ethnopharmacology 133, 261–277

Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. et Khebri, S. 2010. Activite anti-oxydante et Antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* l. Lebanese Science Journal 11(1), 69-81

Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Laglaoui, A. 2016. Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de Mentha : Mentha spicata, Mentha pulegium et Mentha piperita. Phytothérapie 14, 88-96

Basli, A., Chibane, M., Madani, K., Oukil, N. 2012. Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* 10, 2–9

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single Disk method. *The American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496

Benghanou, M.2012.la phytothérapie entre la confiance et mefiance

Benzeggouta, N., 2005. Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments.

Bettayeb, A., 2010. Étude comparative entre les propriétés physiques de base du bois de pin d'Alep et de pin maritime

Biyiti, L.F., Mekoo, D.J.L., Tamzc, V. and Amvam, Z.P.H. 2004. Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine* 13,11–20.

Bolou, G.E.K., Attioua, B., N'guessan, A.C., Coulibaly, A., N'guessan, J.D. et Djaman, A.J. 2011. Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 80, 772 - 790

Celhay, C., 2013. Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante: procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi - vis et étude des conditions subcritiques.

Chagne, D., 2004. Développement de marqueurs moléculaires chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) et cartographie génétique comparée des conifères.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon) tubers. Separation and Purification Technology 55,217–225

Costa, C., Carvalho, L., Masson, D., Méausoone, P.J., 2005. Influence de l'Usinage du Bois sur les Caractéristiques Objectives et sur la Perception Subjective de l'Aspect d'une Finition.

Edeas, M. 2007. Les polyphénols et les polyphénols de thé. Phytothérapie 5, 264-270

El Hilah, F., Ben Akka, F., Dahmani, J., Belahbi, N., Zidane, L. 2015. Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des infections du système respiratoire dans le plateau central marocain. Journal of Animal & Plant Sciences 25(2), 3886-3897

Figureiral, I.1995. Charcoal analysis and the history of *Pinus pinaster* (cluster pine) in Portugal. Review of Palaeobotan and Palynology 89, 441-454

Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N., Núñez, M.J. 2008. Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry 7 (8), 3210-3216

Jean, Marie polese. Arbres et arbustes de méditerranée, 2006, Edisud, un éditeur de la compagnie, un éditeur de la compagnie des éditions de la resse

Jerez, M., Selga, A., Sineiro, J., Torres, J.L., Nunez, M.J. 2007. A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition. Food Chemistry 100, 439–444

Jerez, M., Sineiro, J., Guitian, E and Nunez, M.J. 2009. Identification of polymeric procyanidins from pine bark by mass spectrometry. Rapid Communications In Mass Spectrometry 23, 4013–4018

Jouda, M. M., Elbashiti, T., Masad, A. and Albayoumi, M. 2013. The Antibacterial Effect of Some Medicinal Plant Extract and their Synergistic Effect with Antibiotic. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences 5, 23-33

Hayek, S.A., Ibrahim, S.A., 2012. Antimicrobial activity of Xoconostle pears(*Opuntia matudae*) against *Escherichia coli* O 157:H7 in laboratory medium. Int.J. Microbio, 1–6.

Hayouni, A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M.2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruit extracts. Food Chemistry 105, 1126–1134

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie 1, 3-6

Iravani, S. and Zolfaghari, B. 2011. Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. Research in Pharmaceutical Sciences 6(1), 1–11.

Gendrault, S.,2004. Etude du support d'adsorption : l'écorce de pin « pinus pinaster ».

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

Kahlouche-Riachi, F., 2014, Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie.

Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. 2002. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology 83, 73-77

Mahmoudi, S., Khali, M. Et Mahmoudi, N. 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Revue «Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques 09, 35- 40

Metrouh-Amir, H., Duarte, C.M.M., Maiza, F. 2015. Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products* 67, 249-256

Meullemiestre, A., 2014, Valorisation des déchets de la filière “ bois ” en deux étapes : isolation des molécules extractibles puis fabrication de charbon actif : cas du pin maritime.

Molina-Salinas, G.M., Pérez-Lopez, A., Becerril-Montes P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernandez, S., Waksman de Torres, N.2007. Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*

Muanda, F.N., Dicko, A., Soulimani, R.2010. Chemical composition and biological activities of *Ficus capensis* leaves extracts. *Journal of Natural Products* 3,147-160
109, 435–441

Naczk, M., Shahidi, F.2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054 (2004) 95–111

Nelly, C.B., 2013, prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et Phytothérapie.

Nishioka, K., Hidaka, T., Nakamura, S., Umemura, T., Jitsuiki, D., Soga, J., Goto, C., Chayama, K., Yoshizumi, M. and HIGASHI, Y. 2007. Pycnogenol®, french maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans Pycnogenol®, french maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans. *Hypertens Research* 30, 775–780

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

Pauly, G., Gleizes, M. et Bernard-Dagan, C. 1973. Identification des constituants de l'essence des aiguilles de *pinus pinaster*. *Phytochemistry* 12, 1395-1398

Pierron C., 2014, Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gériatologie et soins palliatifs.

Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Nunez, M.J. 2004. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry* 85, 267–273

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

Larbi, R., 2015. Analyse de la diversité floristique et de la phytodynamique de la série de végétation à *Cedrus atlantica* au Djurdjura Centro-méridional (Secteur de Tikjda).

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 56, 3-12

Rios, J.L., Recio, M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 80–84

Rodríguez Vaquero, M.J., Aredes Fernández, P.A., Manca, M.C. 2007. Phenolic compounds from wine as natural preservatives of fish meat. *Food Control* 18, 93–101.

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

Romani, A., Ieri, F., Turchetti, B., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Buzzini, P. 2006. Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 415–420

Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A. & Hadeif, 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

Saffidine, K., 2015. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L.

Saliou, C., Rimbach, G., Moini, H., Mclaughlin, L., Hosseini, S., Lee, J., Watson, R.R, and Packer, L. 2001. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-b–dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a french maritime pine Bark extract. Free Radical Biology & Medicine 30 (2),154–160

Scalbert, A.1991. Antimicrobial properties of tanins. Phytochemistry 30, 3875-3883.

Simard, F., 2007. Évaluation du potentiel anticancéreux des extractibles du bois de pin rouge.

Sousa, F., Guebitz, G.M., Kokol, V. 2009. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. Process Biochemistry 44, 749-756

Stockigt, J., Sheludkoa, Y., Ungerc, M., Gerasimenkoa, I., Warzecha, H., Stockigt, D. 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic And capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass Spectrometric analysis of selected alkaloid groups. Journal of Chromatography A 967, 85–113

Sultana, B., Anwar, F., Przybylski, R. 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees . Food Chemistry 104, 1106–1114

Taguri, T., Tanaka, T. And Kouno, I. 2006. Antibacterial Spectrum of Plant Polyphenols and Extracts depending upon Hydroxyphenyl Structure. Biol. Pharm. Bull 29(11), 2226-2235 (2006)

Toty, A. A., Guessennd, N., Bahi, C., Kra, A. M., Otokore, D. A. et Dosso, M. 2013. Évaluation *in-vitro* de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de

Harungana madagascariensis sur la croissance de souches multi-résistantes. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège 82, 12 – 21

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

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

Toyang, N.J., Ateh, E.N., Keiser, J., Vargas, M., Bach, H., Tane, P., Sondengam, L.B., Davis H., Bryant, J. , Verpoorte, R. 2012.Toxicity, antimicrobialandanthelminticactivitiesof *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae)crudeextracts . *Journal of Ethnopharmacology*, 1-5

Vivas, M., Nunes, C., Coimbra, M. A., and Solla, A. 2014. Antioxidant activity of *Pinus pinaster* infected with *Fusarium circinatum* is influenced by maternal effects. *Forest Pathology* 44, 337–340

Zeghad, N., 2009. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne.

Zhang, Wen, Jing., Lars Olof Björn. 2009. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia* 80, 207-218.