



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie appliquée

قسم : البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Hygiène Hospitalière

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique des extraits de résine de Pin d'Alep

Présenté par : Bouhellassa Sara
Sakhri Riham

Le : 23/06/2024

Jury d'évaluation :

Présidente : Dr ZITOUNI Hind (M.C.B - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : Dr BATAICHE Insaf (M.C.A - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Examinatrice: Dr MILET Asma (M.C.B - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2024– 2025

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, nous exprimons notre profonde gratitude à Allah, le tout-puissant, pour nous avoir accordé la force, la persévérance et la patience nécessaires à la réalisation de ce modeste travail.

Nos remerciements les plus chaleureux vont à Madame **BATAICHE Insaf**, qui nous a fait confiance en nous encourageant avec notre idée et en nous encadrant avec rigueur et bienveillance. Sa disponibilité, ses conseils avisés et son accompagnement constant ont été d'un grand soutien tout au long de ce parcours.

Nous adressons nos sincères remerciements aux membres de jury, et plus particulièrement à Dr **ZITOUHI Hind**, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider notre soutenance, ainsi qu'à Dr **MILET Asma**, pour avoir accepté d'examiner notre mémoire et d'enrichir notre travail par ces observations.

Nous ne manquerons pas également de montrer notre gratitude à l'ensemble du personnel du département de la microbiologie appliquée notamment le chef de département et tous les professeurs qui nous ont suivi durant nos études.

Notre reconnaissance va également à l'ingénieur de laboratoire de Biochimie en particulier Madame **Zahraoui Chafika**, ainsi qu'à Madame **Slama Meriem** pour leur soutien technique, leurs conseils précieux et leur disponibilité constante lors de nos manipulations en laboratoire.

Nous ne pourrions pas mettre fin à ces remerciements sans associer nos familles et nos amis pour leurs encouragements.

DÉDICACE

A chaque fois qu'on achève une étape importante dans notre vie, on fait une pose pour regarder en arrière et se rappeler toutes ces personnes qui ont partagé avec nous tous les bons moments de notre existence, mais surtout les mauvais

*A mon **cher père**, lumière de mes yeux, jumeau de mon âme, mon compagnon pour toujours sans toi je n'imagine pas avoir pu poursuivre beaucoup de choses, mais je te le dis même si tu n'es plus là, ta petite fille fera toujours tout pour te rendre fier.*

*À ma mère, mes frères **Walaa, Zakaria et Karim**, à mes cousines, à toutes ma famille de près ou de loin.*

*À mes sœurs que dieu ma donnée **Chaima, Nariman et Amina** pour leur présence, leur aide, leur amour et tendresse absolue.*

A toutes ces âmes je dédie ce travail en signe de reconnaissance et de respect.

SARA

DÉDICACE

*Je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volantes
Pour réaliser ce travail.*

*Je tiens C'est avec grande plaisir que je dédie ce modeste travail.
À ma mère **Kenza** et à mon père **Rabah***

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a
apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont
donné confiance, courage et sécurité.*

*À mon cher père, pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Votre souci a toujours été de
satisfaire vos enfants et de ne pas rester indifférent à leurs multiples préoccupations.*

*Vos conseils, votre courage et votre rigueur ont été pour moi d'un soutien inestimable tout
au long de mes études. Trouvez ici l'expression de toute ma considération pour vos multiples
actes de générosités.*

*À **Mes sœurs et mon petit frère** : Raounak, Rahaf, Racha et Racime, mon soutien de ma vie
aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour qui j'ai pour vous*

*À **mon mari** Marouane, pour ton soutien sans faille et ta patience tout au long de ce
parcours.*

*À **mes copines** : Rihane, Soulefa, Dina et Manel Merci pour votre amitié sincère, vos
encouragement et vos précieux moments de partage ,votre présence m'a apporté force, rires
et réconfort dans les moments les plus intenses.*

Merci pour tous les personnes qui m'aide dans ma Parcours d'étude, même si par un mot.

Riham

Table des matières

Remerciements	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Revue bibliographique	
1-Définition de la phytothérapie	3
2-Généralités sur le Pin d'Alep	3
2.1- Description botanique	3
2.2- Noms vernaculaires.....	5
2.3- Répartition géographique du Pin d'Alep.....	5
2.3.1- Dans le monde.....	5
2.3.2- En Algérie	6
3-Résine de Pin d'Alep	7
3.1- Définition	7
3.2- Caractéristiques.....	7
3.3- Composition chimique	7
3.4- Récolte de la résine	7
3.4.1- Méthode traditionnelle.....	8
3.4.2- Méthode modern. . .	8
3.5- Utilisation de la résine	9
4-Métabolites secondaires. . .	10
4.1- Définition	10
4.2- Polyphénols. . .	10

4.3- Flavonoïdes	10
4.4- Tanins.....	11
4.5- Alcaloïdes.....	11
4.6- Saponines	12
4.7- Quinones	12
4.8- Stéroïdes.....	12
4.9- Coumarines.....	12
4.10- Terpénoïdes	12
5- Activités biologiques	13
5.1- Activité antioxydants	13
5.2- Activité antimicrobienne	13
5.2.1- Activité antibactérienne.....	13
5.2.2- Activité antifongique.....	13
5.3- Quelques micro-organismes pathogènes.....	14
5.3.1- Bactéries	14
5.3.2- Les champignons	17
5.4- Effet de la résine de pin d'Alep sur les bactéries gram positive et négative	20
5.4.1- bactéries gram-positives	20
5.4.2- bactéries gram-négatives	20

Matériel et méthodes

1- Préparation du matériel végétal.....	21
1.1- Broyage	21
1.2- Tamisage	21
2- Préparation des extraits.....	22
2.1- Extraction par macération	22

2.1.1- Principe.....	22
2.1.2- Macération méthanolique	22
2.1.3- Macération hydro-éthanolique.....	23
2.2- Extraction à reflux	24
2.2.1- Principe.....	24
2.2.2- Mode opératoire	24
2.3- Concentration sous vide	25
2.4- Rendements des extractions	25
2.5- Screening phytochimique	26
2.5.1- Principe.....	26
2.5.2- Détection des Phénols	26
2.5.3- Détection des Flavonoïdes.....	26
2.5.4- Détection des Tannins	26
2.5.5- Détection des Coumarines	27
2.5.6- Détection des Quinones.....	27
2.5.7- Détection des Terpènes	27
2.5.8- Détection des Stéroïdes	27
2.5.9- Détection des Alcaloïdes	27
2.5.10- Détection des Saponines.....	27
2.6- Dosage colorimétrique des composés phénoliques.....	27
2.6.1- Dosage des polyphénols totaux	28
2.6.2- Dosage des flavonoïdes	28
2.7- Activités biologiques	29
2.7.1- Activité antioxydante	29
2.7.2- Activité antimicrobienne	31

Résultats et discussion

1- Rendement d'extraction de la résine.....	35
2- Screening phytochimique.....	36
3- Dosage colorimétrique des composés phénoliques	40
3.1- Dosage des polyphénols totaux	40
3.2- Dosage des flavonoïdes	42
4- Activités biologiques	43
4.1- Activité antioxydante	43
4.2- Activité antimicrobienne	46
4.2.1- Activité antibactérienne	46
4.2.2- Détermination de la CMI.....	48
4.2.3- Activité antifongique	50

Conclusion et perspectives.....	52
--	-----------

Références bibliographiques.....	55
---	-----------

Annexes

Abstract.

الملخص

Résumé

Liste des figures

Figure 01 : Description des structures botaniques du Pin d'Alep	4
Figure 02 : Aire de répartition du Le Pin d'Alep dans le monde	6
Figure 03 : Répartition du Pin d'Alep en Algérie.....	6
Figure 04 : Méthode de gemmage traditionnelle	8
Figure 05 : Méthode de gemmage en vase clos.....	9
Figure 06 : Structure d'un Phénol simple.....	10
Figure 07 : Structure chimique des différents types de flavonoïdes.....	11
Figure 08: Observation microscopique et macroscopique d' <i>Escherichia coli</i>	14
Figure 09 : Observation microscopique et macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figure 10: Observation microscopique et macroscopique de <i>Pseudomonas</i>	16
Figure 11 : Observation macroscopique et microscopique de <i>Bacillus sp.</i>	17
Figure 12 : Observation microscopique et macroscopique de <i>Candida albicans</i>	18
Figure 13 : Observation macroscopique et microscopique de <i>Fusarium sp.</i>	19
Figure 14 : Observation microscopique et macroscopique d' <i>Aspergillus niger</i>	20
Figure 15 : Résine séchée et broyée	21
Figure 16: Agitation et filtration de la poudre végétale de l'extrait méthanolique	23
Figure 17 : Agitation et filtration de la poudre végétale de l'extrait hydro-éthanolique	23
Figure 18 : Schéma explicatif d'un montage à reflux	24
Figure 19: Montage et procédure d'extraction à reflux	25
Figure 20 : Evaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif.....	25
Figure 21 : Réduction du radical DPPH.....	30

Figure 22 : Etapes de la méthode des puits sur gélose	32
Figure 23 : Préparation des dilutions d'extraits étudiés ; a : extrait hydro-éthanolique ; b : extrait chloroformique ; c : extrait méthanolique.....	33
Figure 24 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique ($\lambda=765$ nm).....	40
Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la quercétine ($\lambda=510$)	42
Figure 26 : Courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la Concentration d'extrait méthanolique de la résine de Pin d'Alep	44
Figure 27 : Courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la Concentration d'extrait hydro-éthanolique de la résine de Pin d'Alep.....	44
Figure 28 : Courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la Concentration d'extrait chloroformique de la résine de Pin d'Alep	45

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne	31
Tableau 02 : Caractéristiques de la souche fongique utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique.....	34
Tableau 03 : Rendement des extraits de résine de Pin d'Alep	35
Tableau 04 : Résultats de screening phytochimique de la résine de Pin d'Alep	36
Tableau 05 : Teneur en phénols totaux dans les trois extraits de Pin d'Alep	41
Tableau 06 : Teneur en flavonoïdes dans les trois extraits de la résine de Pin	42
Tableau 07 : Les valeurs d'IC ₅₀ déterminées par le piégeage du radical DPPH	45
Tableau 08 : Zones d'inhibition de la résine de Pin d'Alep d'extrait méthanolique, extrait hydro-éthanolique extrait chloroformique, et DMSO (Témoin) ; sur les quatre souches bactériennes	46
Tableau 9 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par extrait méthanolique, extrait hydro-éthanolique et extrait chloroformique, et DMSO contre <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Tableau 10 : Zones d'inhibition de la résine de Pin d'Alep d'extrait méthanolique, extrait hydro-éthanolique, extrait chloroformique et DMSO (Témoin) ; sur les souches fongiques...50	

Liste des abréviations

% : Pourcentage.

°C: Degré Celsius

µg : Microgramme

µl : Microlitre

cm: Centimètre

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CSSL: Conservation de la Souche Sylvicole Locale

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DO : Densité optimale.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

E. coli : *Escherichia coli*.

EAG : Equivalent acide gallique.

EQ : Equivalent quercétine.

g: Gramme

GN : Gélose nutritive

h : Heurs.

HCl : Chlorure d'hydrogène.

IC50 : Concentration inhibitrice à 50 %.

mg : Milligramme.

MH : Miller Hinton.

min : Minute.

ml: Millilitre.

Na₂CO₃: Carbonate de sodium.

NaCl: Chlorure de sodium

NaNO₂ : Nitrite de sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

PCBN: Pinus brutia clonal network

PI : Pourcentage d'inhibition.

PLP : Protéines liant la pénicilline.

rpm: Tours par minute

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

SAB : Sabouraud

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

Introduction

L'utilisation de plantes pour atténuer la souffrance humaine est une pratique ancienne, qui remonte à l'aube de l'humanité et demeure toujours d'actualité. Presque toutes les civilisations, depuis l'Antiquité, ont utilisé les plantes comme source de médicaments (**Mukherjee, 2009**). Les propriétés médicinales de différentes espèces végétales ont contribué à l'origine et à l'évolution de nombreuses thérapies traditionnelles et la découverte de médicaments (**Lopez, 2011 ; Malik et al., 2012**).

Les plantes médicinales constituent une source potentiellement inépuisable de composés bioactifs, notamment les métabolites secondaires, qui sont souvent à l'origine des propriétés médicinales des plantes. Ces substances sont aujourd'hui au cœur des recherches pharmaceutiques, qui visent à évaluer leur activité biologique et à exploiter leur potentiel dans le développement de nouveaux médicaments par techniques modernes et traditionnelles (**OMS, 2003 ; El Hilah et al, 2015**).

L'Algérie, grâce à ses différentes zones bioclimatiques (humide, sub-humide, semi-aride, aride ou désertique) et sa situation géographique, occupe une place privilégiée pour l'exploitation, la culture, la production et l'exportation de plantes médicinales et aromatiques (**Reguieg, 2011**).

Dans cette optique, notre travail s'est orienté vers l'étude d'une plante médicinale largement reconnue pour ses propriétés thérapeutiques : Pin d'Alep (résine). Ce dernier occupe une place importante dans la pharmacopée traditionnelle en Algérie, avec des utilisations nombreuses et variées selon les régions et les affections traitées. Ses bienfaits s'étendent à plusieurs systèmes de l'organisme. Il est reconnu pour ses effets bénéfiques sur le système gastro-intestinal respiratoire, urinaire, ainsi que pour sa capacité à stimuler les glandes surrénales (**Benarba et al., 2015**).

Sur le plan thérapeutique, le pin est principalement utilisé comme antiseptique. Il est recommandé dans le traitement des affections respiratoires telles que la bronchite, la pneumonie et le rhume (**Rebbas et al., 2012**). De plus, il présente des propriétés antifongiques notables (**Chermat et Gharzouli, 2015**).

Différentes parties de l'arbre sont employées en thérapie humaine. La résine de Pin d'Alep constitue une source importante riche en composés phénoliques et terpénoïdes, produits par des structures spécialisées de la plante (**Langenheim, 2003**). Elle est sécrétée en réponse aux

agressions d'herbivores ou d'agents pathogènes, jouant ainsi un rôle important dans le mécanisme de défense de l'arbre (**Mohamed *et al.*, 2006**). La résine de pin, en particulier, est utilisée sous forme de poudre mélangée à du miel ou de l'huile d'olive pour soulager la grippe et la toux. Elle était également autrefois utilisée pour traiter l'asthme (**Meddour *et Meddour-Sahar*, 2015**), ainsi qu'en cataplasme contre les rhumatismes (**Rebbas *et al.*, 2012**).

Au-delà de ses usages médicaux, la résine naturelle de pin possède un large éventail d'applications industrielles (encres, collage du papier, des polymères adhésifs, caoutchouc et matériaux divers), ainsi dans les industries agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et de la parfumerie (**Delmond, 2002 ; Mercier *et al.*, 2009 ; Tümen *et Reunanen*, 2010**).

L'objectif de ce travail est de comparer l'efficacité de trois solvants différents (le méthanol, l'hydro-éthanol et le chloroforme) dans l'extraction des métabolites secondaires de la résine de Pin d'Alep, en vue d'optimiser le rendement en composés bioactifs et d'évaluer leur activité biologique.

Notre manuscrit est divisé en trois principales parties ; commençant par une étude bibliographique concernant la résine, les métabolites secondaires, les différentes activités biologiques des extraits naturels. La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale qui porte à la préparation des différents extraits, suivi des méthodes employées pour les investigations phytochimique et biologiques des extraits. Tandis que, la troisième partie est consacrée pour les résultats trouvés et leurs interprétations. Le manuscrit terminera par une conclusion générale concernant nos résultats approuvant l'importance de la résine de la plante dans la médecine traditionnelle.

Revue bibliographique

1-Définition de la phytothérapie

Le mot phytothérapie se compose étymologiquement de deux racines grecques : "photon" et "therapeia" qui signifient respectivement "plante" et "traitement" (**Mansour, 2015**). Alors, les plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**). Elles sont utilisées pour leurs propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine. En effet, elles sont utilisées de différentes manières, décoction, macération et infusion. Une ou plusieurs de leurs parties peuvent être utilisées, racine, feuille, fleur (**Dutertre, 2011**).

Autrement dit, la phytothérapie peut se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes (**Hamoussa et al., 2022**). Parmi ces plantes figure le Pin d'Alep qui occupe une place importante en phytothérapie en raison de sa richesse en composés bioactifs (**Boudjedjou et al., 2020**), ses différentes parties notamment l'écorce, la résine et les aiguilles renferment des polyphénols et flavonoïdes aux propriétés thérapeutiques intéressantes.

2- Généralités sur le Pin d'Alep

Appartenant à la famille des pinacées, le genre *Pinus* comprend plus de 120 espèces réparties à travers le monde, principalement autour du bassin méditerranéen. Les *Pinus* sont généralement des arbres plus rarement des arbustes aux branches régulièrement verticillées, et leurs feuilles sont persistantes et en forme d'aiguilles (**Ching et al., 2010**).

2.1-Description botanique

Le Pin d'Alep est un arbre de taille moyenne de hauteur totale allant de 25 à 27 m. Sa longévité ne dépasse généralement pas 150 ans, il se rencontre dans les étages bioclimatiques méditerranéens ; arides supérieurs, semi-arides, sub-arides et humide. C'est une espèce héliophile et xérophile. Le Pin d'Alep a généralement un tronc tortueux, irrégulier et branchu (**Nahal, 1962**). Comme chez la plupart des conifères, le pin présente plusieurs structures caractéristiques telles que l'écorce, les cônes et les aiguilles etc. (**Figure 01**).

➤ **L'écorce:** Riche en tanin (**Espinosa et al., 2020**). Pour les jeunes sujets sont lisses, de couleur grises argentées; celle des arbres adultes est épaisse, de couleur noirâtre à rougeâtre. L'arbre de pin d'Alep produit, ainsi, de la résine par Gemmage. Une opération qui consiste à blesser le tronc de l'arbre pour stimuler la cicatrisation par l'envoi de résine (**Boutchiche et Boutrigue, 2016**).

➤ **Les aiguilles (Les feuilles) :** Sont fasciculées par 2 dans le brachyblaste (rarement 3 à 5), filiformes, molles, vert jaunâtre, lisses, fines, de moins de 1 mm d'épaisseur, 6 à 10 cm de long (**Nahal, 1962**).

➤ **Les Cônes:** sont ovoïdes, aigues, de couleur brun luisant, portés par un pédoncule épais constamment recourbé (**Grossenbacher, 2011**), gros d'une taille de 6 à 12 cm ils sont souvent isolés et réfléchis ; La maturité des cônes estimée par le changement de couleur de vert à rouge violacée, et à maturité deviennent brun rougeâtre à jaunâtre (**Fekih, 2015**).

➤ **Les grains** s'échappent au cours du mois de juillet, août de la troisième année d'apparition du cône (**Kadik, 1987**). La forme est ovoïde bombée à trois angles, couleur grise avec une taille de 0.6 cm (**Kadri, 2014**) et lisse chez les jeunes arbres, puis brune rougeâtre, en taille mince et large chez les plus âgés (**Nahal, 1962**).

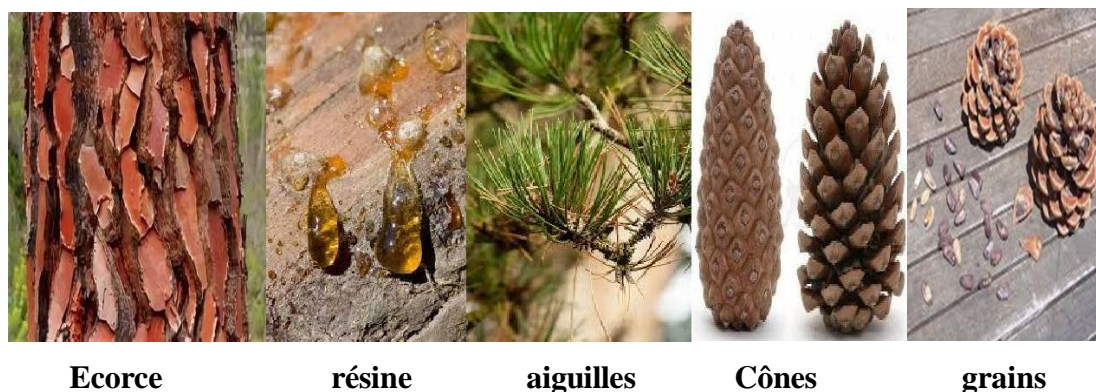


Figure 01 : Description des structures botaniques du Pin d'Alep.

2.2-Noms vernaculaires

On trouve plusieurs appellations selon les pays.

- **Français** : Pin d'Alep, Pin blanc, Pin de Jérusalem (**Nahal, 1962**).
- **Arabe** : Sanawbar halabi
- **Berbère**: Azoumbei, tayada

2.3-Répartition géographique du Pin d'Alep

2.3.1-Dans le monde

Le Pin d'Alep est répandu dans le bassin occidental de la Méditerranée, à l'exception de l'Egypte. On le trouve en abondance en Algérie, en Tunisie et au Maroc (**Nahal, 1986**), ou il couvre une superficie estimée à 2,5 millions d'hectares dans la région méditerranéenne (**Quezel, 2000**). Plus précisément, il occupe environ 370000 hectares de la surface arboricole en Tunisie et 65000 hectares au Maroc, répartis dans le Rif, le moyen et le Haut Atlas (**Ammari et al.,2001**). En France, cet arbre s'étend sur plus de 36000 hectares, pouvant atteindre jusqu'à 232000 hectares (**Brochiero et al.,1999**), tandis qu'en Italie, la superficie totale qu'il occupe est estimée à 20000 hectares (**Pardé,1957 ; Haffane,1982**) (**Figure 02**).



Figure 02 : Aire de répartition du Le Pin d'Alep dans le monde (Caudullo *et al.*, 2017).

2.3.2-En Algérie

En Algérie, le Pin d'Alep dans le paysage forestier algérien est considérable, puisqu'il représente plus de 35 % de la superficie totale des forêts du pays, égal à 881.000ha (Derouche, 2015 ; Lakreb, 2022). Présent sur toute l'étendue des étages bioclimatiques algériens du nord, du littoral à l'Atlas saharien, domine particulièrement l'étage 'semi-aride (Khadoumi *et al.*, 2014). Dans la région de l'Est, il s'est développé dans les forêts des monts de Tébessa et des Aurès. Dans la région du centre, il se localise au niveau des forêts d'Ouarsenis. En Ouest, il est très bien représenté dans les zones suivantes : Mascara, Sidi Bel Abbès, les montagnes boisées de Saïda, et l'Atlas saharien, dans les forêts des monts Ouled Nail, près de Djelfa et Djebel Amour, près d'Aflou (Lakreb, 2022) (Figure 03).

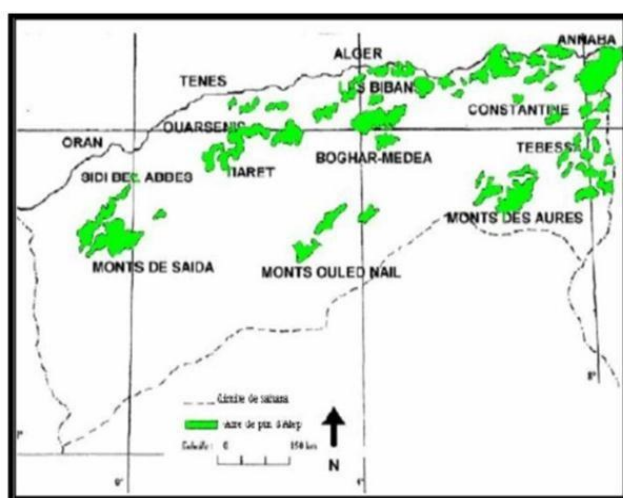


Figure 03 : Répartition du Pin d'Alep en Algérie (Bentouati, 2006).

3- Résine de Pin d'Alep

3.1-Définition

La résine de Pin d'Alep également appelée gemme (**Ravelonirina, 2022**) est constituée d'un ensemble d'acides résiniques, synthétisés dans des canaux résinifères de l'arbre, ou ils sont stockés (**Joye et Lawrence, 1967**).

Le produit majeur de cette espèce est la résine. Elle est d'abord fluide, puis elle durcit en s'oxydant formant des solides cassantes jaunâtres et translucides insolubles dans l'eau mais solubles dans l'alcool, fusibles mais non volatiles (**Modugno et al., 2006**).

3.2-Caractéristiques

Cette substance se présente sous une forme conglomérat pâteuse, rappelant des pierres, et se distingue par sa couleur marronne jaunâtre. Elle possède un goût amer et dégage une Odeur forte et pénétrante.

3.3-Composition chimique

Ces résines sont des mélanges liposolubles de composés terpénoïdes volatils et/ ou non volatils et de composés phénoliques, sécrétés par des structures spécialisées localisées à l'intérieur ou à la surface des organes de la plante (**Langenheim, 2003**).

✓ Résines terpéniques

La résine du Pin d'Alep est une source de monoterpènes et de térébenthine, cette dernière étant notable pour sa richesse en qui se caractérise en α -pinène. L'essence de térébenthine, contenant 89% de α -pinène (**Ghanmi et al., 2007**).

✓ Résines phénoliques

En tant que source importante de biomasse pour les combustibles les résines phénoliques sont souvent intégrées aux remèdes employés en médecine traditionnelle. Leurs constituants dérivent d'hydrates de carbone produits durant de la photosynthèse et les diverses voies métaboliques (**Langenheim, 2003**).

3.4-Récolte de la résine

La récolte, principalement printanière, est effectuée manuellement à l'aide d'un couteau et ensuite placée dans des sachets en plastique ou dans des sachets en papier ou dans des boîtes à matière variable (métal, porcelaine, verre, plastique). La résine pure sans débris de bois du tronc ou des branches se conserve seule pour usage interne, tandis que celle prélevée avec des

morceaux de bois est destinée à l'usage externe. Elle se conserve facilement et pour de longue durée (**Ghanmi et al., 2007**).

3.4.1-Méthode traditionnelle

L'extraction de la résine des Pin d'Alep d'environ 30 ans s'effectue par une technique appelée « Gemmage » (**Rodríguez et al., 2014**). D'après « Système de Hugos" breveté en 1844, le gemmage consiste à réaliser une blessure à l'aide d'un outil (hâpshot) au niveau de l'écorce de l'arbre .

La gemme s'écoule alors dans un récipient placé au pied de l'incision, maintenue par un clou et une lamelle de Zinc. Une fois l'extraction terminée, de l'acide sulfurique est appliqué sur la surface de la blessure, ce qui empêche sa cicatrisation, et stimuler sa biosynthèse (**Rodrigues et al., 2009**) (**Figure 04**).



Figure 04 : Méthode de gemmage traditionnelle (Fancès, 2019).

3.4.2-Méthode moderne

La récolte s'effectue dans un récipient en plastique fermé, fixé à l'entaille pour prévenir l'oxydation de la résine au contact de l'air (**Holiste, 2017**). Une pique sera réalisé à l'aide d'une perceuse équipée d'une scie cloche. Finalement un acide organique naturel est appliqué au lieu de l'acide sulfurique, dans le but de protéger l'arbre (**Bernard, 1988**) (**Figure 05**).



Figure 05 : Méthode de gemmage en vase clos (Fancès, 2019).

3.5-Utilisation de la résine

Le Pin d'Alep est utilisé depuis longtemps en médecine traditionnelle dans divers pays, où il est considéré comme une source thérapeutique essentielle.

La résine de Pin est utilisée sous forme de poudre, combinée à du miel pour soigner les problèmes digestifs et des intestinaux. On la mâche aussi pour nettoyer la bouche et rafraîchir l'haleine. Elle sert comme antidiabétique et pour traiter les ulcères du tube digestif et les blessures (Satil *et al.*, 2011). La résine de pin a des effets diurétiques, émollients, stimulants, antiseptiques, anthelminthiques, insecticides, désinfectants, cytotoxiques, antibactériens, antifongiques, spasmolytiques, cicatrisants (Shuaib *et al.*, 2013; Rashid *et al.*, 2015).

En médecine traditionnelle algérienne, la résine de Pin d'Alep est considérée comme antiseptique puissant. Elle a des formes d'usages externes et internes.

- Pour les usages externes, elle est utilisée afin de prévenir et de traiter les maladies infectieuses respiratoires, pulmonaires, grippe, rhumatisme, maladies infectieuses fongiques, et la sinusite, en la mélangeant soit avec le miel ou l'huile d'olive, puis l'appliquer sur le dos, la poitrine ou sur les parties infectées.
- Pour les usages internes, elle est incorporée à l'état liquide dans l'huile d'olive, ou bien à l'état solide dans le miel. L'administration de ces mélanges se fait une fois par jour (Boulâacheb, 2010).

4- Métabolites secondaires

4.1- Définition

Les métabolites secondaires sont des composés organiques produits par des organismes vivants (principalement les plantes, champignons, bactéries et certains animaux), qui ne sont pas directement impliqués dans les fonctions vitales de base, comme la croissance, le développement ou la reproduction (**wink,2003**). Ils sont généralement spécifiques à certaines espèces ou familles biologiques, et leurs productions est souvent induite par des conditions de stress biotique ou abiotique (**Pichersky et Lewinsohn,2011**).

Ils constituent une source importante de molécules bioactives utilisées par l'homme dans différents domaines (**Jacques et al., 2005**), notamment en médecine moderne (**Dominique et al., 2005**), mais sont donc utilisées principalement dans le domaine écologique comprenant : la défense chimique (**Bennett et Wallsgrave,1994**), la communication chimique inter-espèces ou intra-espèces (**wink,2003**) et la protection contre les UV ou le stress oxydatif (**Taiz et al.,2015**).

4.2- Polyphénols

Les polyphénols ou bien les composés phénoliques, sont une classe étendue de métabolites secondaires principalement élaborés par les plantes. Leurs structures chimiques sont définies par l'intégration d'un ou plusieurs groupements hydroxyle (-OH) sur des cycles aromatiques (**Dai et Mummer,2010**). Il se subdivisent en diverses catégories comme : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les tanins (**Cheyrier et al.,2013**) (**Figure 06**).

Chez l'humain ces composés sont reconnus pour leurs multiples activités biologiques bénéfiques, notamment leur rôle d'antioxydants puissants, capable de neutraliser les radicaux libres et ainsi de réduire le stress oxydatif. Ils démontrent également des effets anti-inflammatoires, antimicrobiens, antidiabétiques, anticancéreux et cardioprotecteurs (**Manach et al.,2004**).



Figure 06: Structure d'un Phénol simple (**Richter, 1993**).

4.3-Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques très importants responsables dans la coloration des parties de la plante (fleurs, feuilles, fruits) (**Benabied et al., 2022**). Ils ont une structure de base unique avec 15 atomes de carbone, arrangé en une molécule C6-C3-C6 : deux anneaux

aromatiques (A et B) sont liés par un petit anneau à trois carbones (C) (**Panche *et al.*,2016**). On les divise en plusieurs groupes (Figure 07) selon leur niveau d'oxydation et la façon dont leur cycles central est modifié (**Pietta,2000**).

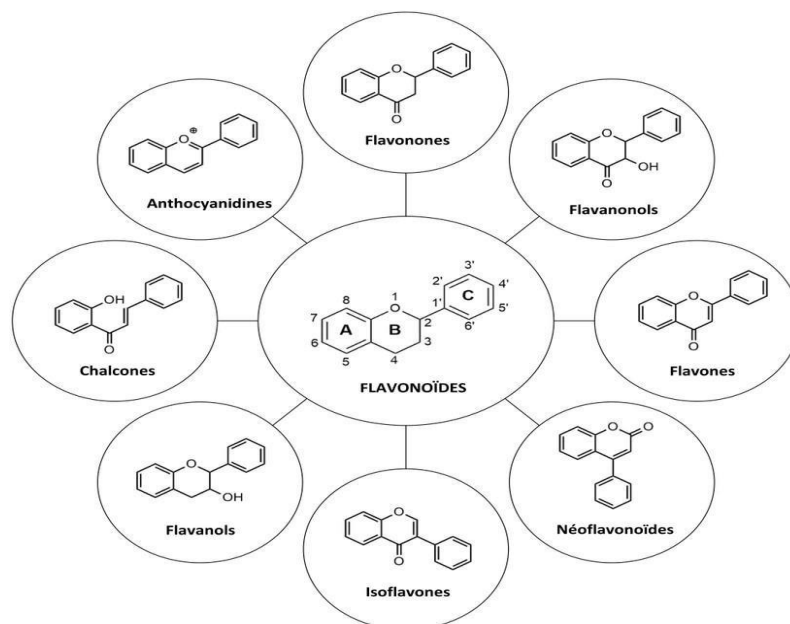


Figure 07 : Structure chimique des différents types de flavonoïdes (Pauline, 2019)

4.4-Tanins

Les tanins tirent leurs principales propriétés biochimiques de leur capacité à interagir avec les protéines et à les précipiter à un pH neutre. Ils constituent un groupe complexe de polyphénols solubles dans l'eau qui ont des propriétés physiques et chimiques similaires et réagissent donc de manière similaire, mais à des degrés divers, avec d'autres composés (**Makkar, 2003**).

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins qui diffèrent par leur réactivité chimique et par leur composition : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

- **Tanins hydrolysable:** Sont constitués de dérivés d'acide gallique ou ellagique estérifiés à un noyau glucidique, le plus souvent du glucose. Ils peuvent être hydrolysés en acides par des enzymes ou des acides forts (**Haslam,1996 ; Okuda *et al.*,2005**).
- **Tanins condensés :** Ils sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols et ne sont pas hydrolysables (**Krief, 2003**).

4.5-Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques végétaux hétérocycliques de structure complexe, contenant un atome d'azote (**Donatien, 2009**). Sont biosynthétisés à partir d'acide aminés

comme la tyrosine (**Zhang et al.,2022**). Ils peuvent être classés selon leur structure en alcaloïdes vrais, pseudo-alcaloïdes et proto-alcaloïdes (**Belgacem et Hemideche, 2023**).

4.6-Saponines

Le nom saponine dérive du mot latin "*sapo*", signifiant "savon" en référence à leurs propriétés de formation de solutions moussantes en présence d'eau (**Haïoun et Hamoud, 2015**). Ce sont des hétérosides composés d'une partie aglycone (lipophile) et d'une partie osidique (hydrophile) (**Marref, 2018**).

4.7-Quinones

Ce sont des produits de l'oxydation de dérivés aromatiques, présentant des motifs tel que le 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique ou 1,2-dicétocyclohexa-3,5- diénique. Ils se conjuguent aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé comme le naphthalène (naphtoquinones), l'anthracène (anthraquinones) et la naphtodianthrène (naphtodianthrone) (**Benabied et al., 2022**).

4.8-Stéroïdes

Les stéroïdes sont des composés lipidiques dérivés du noyau stérane, constitués de trois cycles cyclohexanes et un cycle cyclopentane fusionnés, formant une structure à 17 atomes de carbone (**Zahoor et al.,2023**). Ils sont produits naturellement par les plantes jouant des rôles biologiques essentiels dans la régulation hormonale, la croissance cellulaire et métabolisme (**Jin et al.,20022**).

4.9-Coumarines

Les coumarines sont des composés aromatiques naturels appartenant à la famille des benzopyrones, caractérisés par une structure de lactone fusionnée à un noyau benzénique. Sont classés en plusieurs sous-groupes notamment : les coumarines simples, les furocoumarines, les pyranocoumarines, les phénylcoumarines et les biscoumarines, selon leurs structures chimiques spécifiques (**Lateef et al.,2023**).

4.10-Terpénoïdes

Les terpènes (Terpénoïdes) représentent la plus grande classe de composés organiques naturels avec plus de 40 000 structures signalées à ce jour. Sa structure chimique de base est constituée d'une unité isoprène (C₅H₈). Selon le nombre d'unités d'isoprène, les terpènes sont classés en : monoterpènes (C₁₀) - Les sesquiterpènes (C₁₅) - Les diterpènes (C₂₀) - Les triterpènes (C₃₀) - Les tétraterpènes (C₄₀) - Les polyterpènes (>C₄₀) (**Kyoung et al., 2017**) Les terpénoïdes sont responsable de l'odeur typique de nombreuses plantes et ils interviennent dans la stabilisation

des membranes cellulaires, régulateurs de la perméabilité et des réactions enzymatiques. Ils ont démontré leur efficacité dans la chimioprévention et la chimiothérapie du cancer et expriment des activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antihyperglycémiques, anti-inflammatoires et antiparasitaires (**Roman et al., 2007**). Ces molécules se présentent en forme des huiles essentielles, pigments (carotène), hormones (acide abscissique), des stérols (cholestérol) (**Adouane, 2016**).

5- Activités biologiques

5.1-Acitivité antioxydants

La pathogenèse de nombreuses affections chroniques est liées au stress oxydatif, un processus où les radicaux libres endommagent les cellules (**Rahila et al., 2022**). Les extraits de plantes offrent une solution grâce à leurs puissantes molécules antioxydants, capables d'inactiver ces radicaux et de rétablir l'équilibre oxydatif (**Rahila et al., 2022**). Le stress oxydant, résultant d'une production excessive de radicaux libres par rapport aux défenses antioxydants (**Aliouat et Boukelia, 2012**), peut être combattu par les composés actifs des plantes, qui présentent également des propriétés antimicrobiennes (**Flieger et al., 2021**). L'efficacité de ces antioxydants est mesurable par des techniques photométriques (**Marc et al., 2004**).

5.2- Activité antimicrobienne

5.2.1-Acivité antibactérienne

La résistance bactérienne et les effets secondaires des antibiotiques conventionnels incitent à explorer des sources naturelles pour découvrir des agents thérapeutiques innovants et respectueux de l'environnement (**Muzzamal et al., 2012**).

La recherche récente s'oriente vers l'étude d'extrait de plante et de bactéries, de métabolites secondaires et de molécules de synthèse comme agents antibactériens potentiels, distinguant les activités bactéricides (létale) et bactériostatiques (inhibition de la croissance) (**Buronzo, 2008**).

5.2.2-Activité antifongique

Les mycoses, infections d'origine fongique, peuvent être potentiellement traitées par les métabolites secondaires des plantes. La recherche suggère leur efficacité à inhiber la croissance fongique et la biosynthèse de mycotoxines (**Daoudi et al., 2017**).

5.3- Quelques micro-organismes pathogènes

5.3.1- Bactéries

❖ *Escherichia coli*

✓ Description

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie à Gram négatif, en forme bacille, aérobie facultative. Appartenant aux Entérobactéries. Elle mesure environ 1 à 3 µm de long et peut se déplacer grâce à ses flagelles péritriches aussi elle est non sporulée (Madigan *et al.*, 2018). (Figure 08).

✓ Habitat

Escherichia coli est une bactérie commensale du système digestif des mammifères, notamment l'intestin. En plus elle peut survivre temporairement dans l'eau, le sol ou des surfaces, ce qui en fait un indicateur de contamination fécale dans l'environnement (Tortora *et al.*, 2020).

✓ Virulence et pathogénicité

Certaines souches pathogènes possèdent des facteurs de virulence comme : adhésines, toxines, systèmes de sécrétion, capsule et gènes de résistance aux antibiotiques (Kaper *et al.*, 2004).

Escherichia coli est responsable d'infections extra-intestinales telles que les infections urinaires, abdominales, méningées néonatales et les septicémies avec choc septique. En ce qui concerne les infections intestinales, certaines souches d'*Escherichia coli* provoquent des diarrhées sporadiques ou épidémiques (Denis, 2000).



Figure 08 : Observation microscopique et macroscopique d' *Escherichia coli* (Kabir *et al.*, 2016 ; Berkmen *et al.*, 2016)

❖ *Staphylococcus aureus*

✓ Description

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positive, en forme de coque, disposée typiquement en amas rappelant une grappe de raisin. Elle est immobile, non sporulée, catalase

positive et coagulase positive (ce qui la distingue d'autres espèces du genre *Staphylococcus*). Elle pousse en aérobiose et anaérobiose facultative (**Madigan et al.,2018**) (**Figure 09**).

✓ **Habitat**

Staphylococcus aureus est un commensal opportuniste que l'on retrouve principalement sur la peau et dans les muqueuses (nez, gorge) de l'être humain. Environ 20 à 30 % des individus sont porteurs sains. Il peut survivre longtemps dans l'environnement (air, surfaces, objets) (**Tortora et al.,2020**).

✓ **Virulence et pathogénicité**

Staphylococcus aureus possède une grande variété de facteurs de virulence, notamment : toxines, enzymes, protéine A et biofilm (**Otto,2014**).

Il est un pathogène opportuniste pouvant causer des infections bénignes à graves : Infections cutanées, Infections systémiques, Toxi-infections et forme résistante : SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline), un problème majeur en milieu hospitalier (**Lowy,1998**).

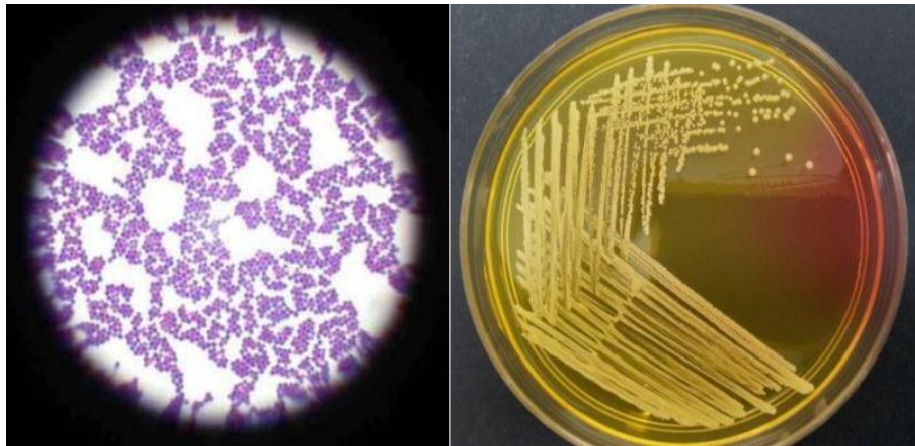


Figure 09: Observation microscopique et macroscopique de *Staphylococcus aureus* (**Ragab et al., 2021 ; Aryal, 2022**).

❖ ***Pseudomonas aeruginosa***

✓ **Description**

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram négatif, en forme de bacille droit ou légèrement incurvé, mobile grâce à un flagelle polaire unique, aérobie stricte, non sporulée, oxydase

positive et catalase positive. Elle peut produire des pigments caractéristiques : pyocyanine (bleu-vert), pyoverdine (jaune-vert fluorescent), entre autres (Ryan *et al.*, 2022) (Figure 10).

✓ Habitat

C'est un saprophyte ubiquitaire : il vit naturellement dans les sols, les eaux, les milieux humides, les surfaces hospitalières et les dispositifs médicaux. On le trouve aussi comme colonisant opportuniste dans la peau, les voies respiratoires et les intestins (Todar, 2012).

✓ Virulence et pathogénicité

P. aeruginosa possède une panoplie de facteurs de virulence permettant l'adhésion, l'évasion immunitaire, et la destruction tissulaire tels que : pigments toxiques, enzymes extracellulaires, système de sécrétion de type III, biofilm, efflux (Hauser, 2009).

C'est un pathogène opportuniste majeur, notamment en milieu hospitalier. Il est associé à des Infections respiratoires graves chez les patients atteints de mucoviscidose, Infections urinaires nosocomiales, Otites externes malignes, Brûlures infectées, Endocardites chez les toxicomanes, Bactériémies et sepsis. Sa pathogénicité repose sur sa capacité à former des biofilms résistants aux antibiotiques et à échapper au système immunitaire (Gellatly et Hancock, 2013).



Figure 10: Observation microscopique et macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* (Mubbunu, 2023).

❖ *Bacillus* sp.

✓ Description

Le genre *Bacillus* regroupe des bactéries Gram positives, aérobies ou anaérobies facultatives, en forme de bacilles droits. Elles sont mobiles (flagelles péritriches), sporulées, et forment

Souvent de longues chaînes. Ces bactéries sont ubiquitaires, certaines espèces sont inoffensives, d'autres sont pathogènes (Madigan *et al.*,2018) (Figure 11).

✓ **Habitat**

Les espèces du genre *Bacillus* sont des organismes saprophytes présents dans de nombreux environnements : Sol, eau, végétation, Produits alimentaires (Logan *et De Vos*, 2009).

✓ **Virulence et pathogénicité**

Bacillus responsable des toxi-infections est un agent causal de la maladie syndrome de diarrhée, syndrome émétique et les infections opportuniste (Logan *et Rodríguez-Díaz*, 2012).

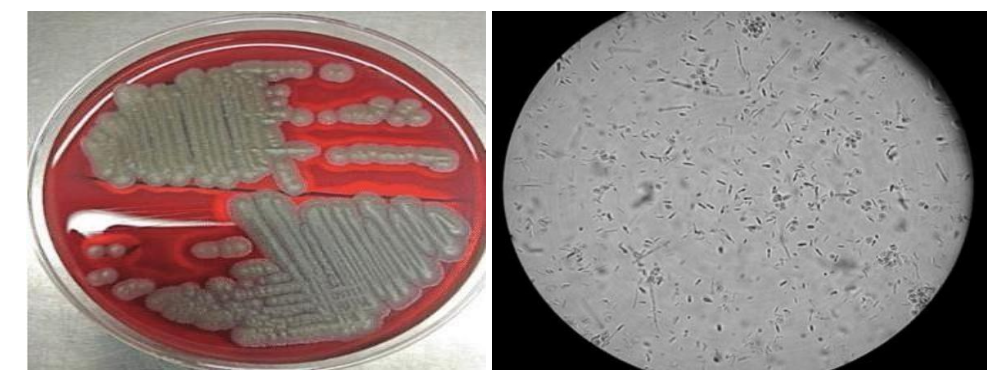


Figure 11 : Observation macroscopique et microscopique de *Bacillus* sp. (Ali *et al.*,2017;Haque *et al.*, 2020).

5.3.2- Les champignons

Les champignons, aussi appelés mycètes, sont des organismes eucaryotes unicellulaire ou pluricellulaires, dont la structure est similaire à celle des organismes végétaux. Ils sont des hétérotrophes et ne possèdent pas de chloroplastes (Carip, 2008) (Figure 12).

❖ *Candida albicans*

✓ **Description**

Candida albicans est une levure dimorphique capable de se transformer en cellules bourgeonnantes, pseudohyphes ou hyphes véritables selon l'environnement. Cette plasticité morphologique est essentielle à sa virulence. C'est un champignon eucaryote, à paroi cellulaire riche en mannanes, glucanes et chitine (Brandquist *et al.*,2023) (figure 12).

✓ Habitat

Candida albicans est un commensal naturel des muqueuses humaines : cavité buccale, vagin, tractus gastro-intestinal et peau. Il reste généralement inoffensif, mais peut devenir pathogène si l'immunité est affaiblie ou si la flore bactérienne est déséquilibrée (Yang *et al.*, 2023).

✓ Virulence et pathogénicité

Les principaux facteurs de virulence de *C. albicans* incluent : Transition morphologique, Biofilm, Enzymes hydrolytiques, Toxine Candidalysine et Échappement immunitaire (Mayer *et al.*, 2024).



Figure 12 : Observation microscopique et macroscopique de *Candida albicans* (Ghimire *et al.*, 2020).

❖ *Fusarium sp.*

✓ Description

Fusarium sp. est un champignon filamenteux de forme imparfaite (anamorphe), caractérisé par un mycélium septé fin, clair et frisé, de couleur rose saumon. Ses colonies sont hyalines, unicellulaires, sur conidiophore de 3 à 5 µm de diamètre (Mebark, 2016). Il se caractérise par ses spores multicellulaires (macroconidies) en forme de croissant et la production de mycotoxines (Wang *et al.*, 2023). (Figure 13).

✓ Habitat

Les *Fusarium spp.* sont ubiquistes, présents dans les sols agricoles, débris végétaux, eau douce. Ils colonisent les plantes (racines, tiges, graines) de façon opportuniste. De plus, ils résistent longtemps dans l'environnement via chlamydospores (Sogoba *et al.*, 2023).

✓ Virulence et pathogénicité

Les principaux facteurs de virulence incluent: mycotoxines, enzymes dégradant la paroi végétale, petites protéines effectrices responsables du contournement de la défense de l'hôte et la capacité d'adaptation au stress environnemental (pH, température) (Wang *et al.*, 2023).

Chez l'humain, *Fusarium sp.* peut provoquer des infections opportunistes telles que des kératites, des onychomycoses et des fusarioses systémiques ,particulièrement chez les individus immunodéprimés .De plus, il présente une résistance antifongique élevée (Nucci *et Anaissie*, 2022).

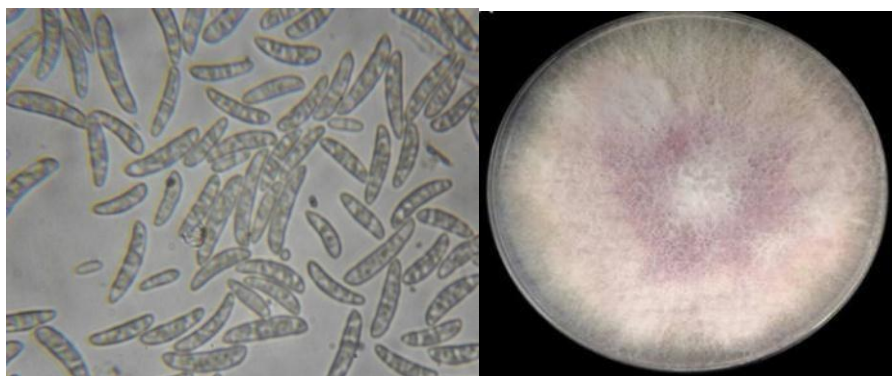


Figure 13 : Observation macroscopique et microscopique de *Fusarium sp* (Cutuli *et al.* 2015 ; Akhtar *et al.*, 2017)

❖ *Aspergillus niger*

✓ Description

Aspergillus est un champignon pluricellulaire filamenteux, atteignant un diamètre de 4 à 5 cm. Il présente un mycélium septé et ramifié. Ses colonies sont de couleur noire (Marijon *et al.*, 2020) (Figure 14).

Cette espèce est largement exploitée dans l'industrie pour la production d'enzymes et d'acides organiques, notamment l'acide citrique (Pel *et al.*,2007).

✓ Habitat

Aspergillus niger se développe sur la matière organique en conditions aérobies. Il est un contaminant sur divers substrats ; on le trouve dans le sol, sur la matière végétale et même dans les environnements marins, bien qu'il préfère les sols secs et chauds (Botton *et al.*, 1990).

✓ Virulence et pathogénicité

Les spores d'*Aspergillus*, présentes dans l'air, ciblent l'appareil broncho-pulmonaire par pénétration respiratoire. Elles sont responsables de plus de 80% des maladies aspergillaires chez l'homme (CDC, 2024).



Figure 14 : Observation microscopique et macroscopique d'*Aspergillus niger* (Basil *et al.*, 2021).

5.4- Effets antibactériens de la résine de Pin d'Alep

5.4.1- Bactéries à Gram-positif

La résine du Pin d'Alep démontre une activité antibactérienne marquée contre les bactéries Gram-positives, principalement grâce à sa richesse en flavonoïdes et composés phénoliques (Boukhatem *et al.*, 2014). Ces substances provoquent des altérations de la paroi cellulaire, augmentent la perméabilité membranaire et perturbent les fonctions enzymatiques intracellulaires (Cushnie *et Lamb*, 2005). Les souches comme *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus subtilis* se révèlent particulièrement sensibles à ces extraits (Djebli *et al.*, 2016). Cette efficacité est souvent attribuée à la facilité de diffusion des composés actifs à travers la paroi épaisse mais perméable des bactéries Gram-positives (Nikaido, 2003).

5.4.2- Bactéries à Gram-négatif

L'effet de la résine de Pin d'Alep est plus modéré, en raison de la complexité structurale de leur membrane externe riche en lipopolysaccharides, qui limite la pénétration des substances actives (Nikaido, 1996). Néanmoins, des extraits concentrés de résine ont montré une inhibition partielle contre des souches comme *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Benyoucef *et al.*, 2017), notamment grâce à la présence de diterpènes et d'acides résiniques capables d'altérer la structure de la membrane externe (Zengin *et al.*, 2018).

Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau de l'Université Constantine1 dans les laboratoires pédagogiques, faculté des sciences de la nature et de vie, et au laboratoire de laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) à CHAAB RSSAS.

Dans ce contexte, notre étude porte sur l'extraction, l'identification et la quantification des composés phénoliques, suivies par l'évaluation des activités biologiques à savoir la capacité antioxydante et l'activité antimicrobienne de trois extraits : méthanolique , hydro-éthanolique et chloroformique de la résine de Pin d'Alep. Ainsi, l'objectif est de comparer leurs efficacités et de déterminer le solvant le plus performant.

1-Préparation du matériel végétal

La résine du Pin d'Alep a été achetée chez un herboriste au niveau de la ville de Mila (Chelghoum L'Aïd). La résine utilisée est récoltée à Sétif (en 2024), séchée à l'air libre à l'abri de la lumière et stockée dans des conditions appropriées.

1.1- Broyage

Les petites pierres de la résine ont été broyées manuellement à l'aide d'un mortier, puis à l'aide d'un broyeur électrique, ensuite tamisés pour obtenir une poudre fine (**Figure 15**).



Figure 15 : Résine séchée et broyée.

1.2-Tamisage

Le broyat de la résine a été tamisé à travers un tamis de 0,2 mm de diamètre afin de récupérer une poudre très fine, puis conservé soigneusement dans des flacons fermé, à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'au jour de leur utilisation.

2-Préparation des extraits

La préparation des extraits a été réalisée selon deux procédés distincts : l'extraction par macération à température ambiante et l'extraction par reflux, permettant une meilleure récupération des composés bioactifs.

2.1-Extraction par macération

2.1.1- Principe

La macération est une méthode d'extraction consistant à immerger une substance végétale sèche ou fraîche dans un solvant à température ambiante pendant un certain temps, pour récupérer un extrait liquide qui contient des principes actifs dissous (**Bisset et Wichtl, 2001 ; EMA,2016**).

Dans ce présent travail, la macération a été réalisée en utilisant deux solvants différents, conduisant à l'obtention d'un extrait méthanolique et d'un extrait hydro-éthanolique.

2.1.2- Macération méthanolique : est une technique d'extraction utilisée pour isoler les composés bioactifs en particulier les métabolites secondaires (**Harborne,1998**). Le méthanol est un solvant polaire efficace capable de solubiliser un large éventail de composés organiques (**Parekh et Chanda ,2007**).

➤ Mode opératoire

Selon le protocole décrit par **Pacôme et Augustin (2018)** :

- **Extrait méthanolique** : 10 g de la poudre de la résine sont mis à macérer dans 250 ml de méthanol dans un bécher, sous agitation magnétique (100-150 tr/min), à température ambiante pendant 24 heures et à l'abri de lumière. Ensuite, le mélange a été filtré à l'aide du papier filtre, pour recueillir l'extrait liquide, puis conservé dans un flacon hermétique à une température de 4°C, à l'abri de la lumière, afin de préserver ses propriétés (**Figure16**).



Figure 16: Agitation et filtration de la poudre végétale de l'extrait méthanolique.

2.1.3-Macération hydro-éthanolique : est une méthode d'extraction qui utilise un mélange d'eau et d'éthanol pour extraire les principes actifs d'une plante (**Harborne,1998**). L'éthanol permet d'extraire des substances peu solubles dans l'eau, tandis que l'eau facilite l'extraction de composés plus polaires (**Sasidharan et al.,2011**).

➤ **Mode opératoire**

Selon le protocole décrit par **Pacôme et Augustin (2018)** :

- **Extrait hydro-éthanolique :** 20 g de la poudre de la résine sont mis à macérer dans 200 ml de solution éthanol-eau (70:30) dans un bécher, sous agitation magnétique (100-150 tr/min) à température ambiante pendant 24 heures et à l'abri de lumière. Ensuite, le mélange a été filtré à l'aide du papier filtre pour recueillir l'extrait liquide et conservez le filtrat dans un flacon hermétique à une température de 4°C, à l'abri de la lumière, afin de préserver ses propriétés (**Figure17**).

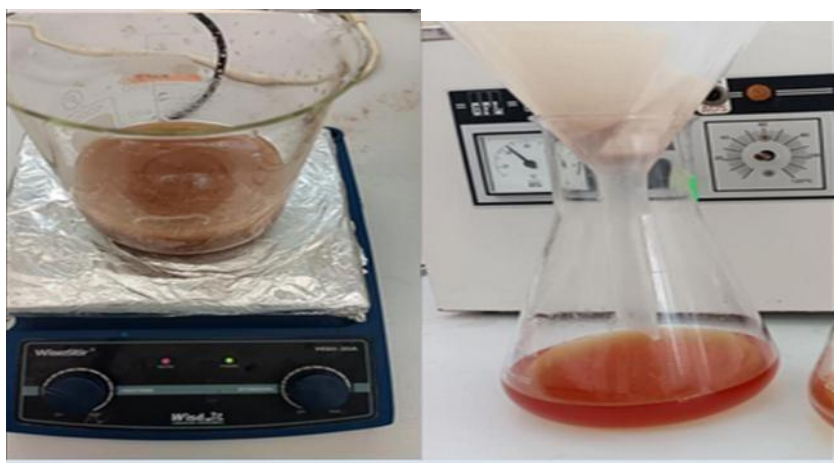


Figure 17: Agitation et filtration de la poudre végétale de l'extrait hydro-éthanolique.

2.2-Extraction à reflux

2..2.1-Principe

L'extraction à reflux est une technique couramment utilisée pour extraire des composés solubles à partir de matières végétales ou autres matrices solides en utilisant un solvant chauffé (**Harborne,1998**). Elle fonctionne grâce à un système dans lequel le solvant s'évapore, se condense dans un condenseur, puis retourne continuellement dans un ballon d'extraction, assurant un contact prolongé entre le solvant chaud et l'échantillon (**Sasidharan *et al.*,2011**). Enfin, après extraction, le solvant est généralement évaporé sous vide pour obtenir un extrait concentré (**Sarker *et al.*,2006**) (**Figure 18**).

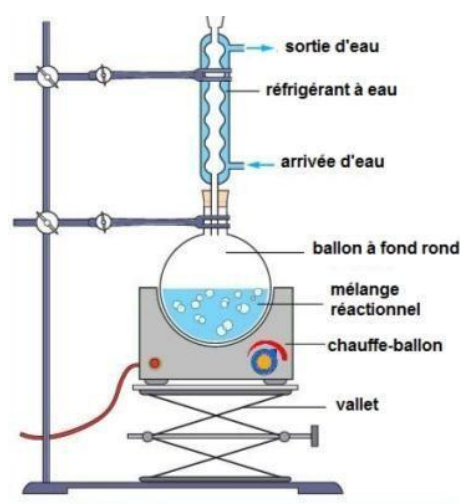


Figure 18 : Schéma explicatif d'un montage à reflux (**Larousse ,2020**).

2.2.2-Mode opératoire

10 g de la poudre de la résine sont mis à chauffer sous reflux dans 200 ml de chloroforme pendant 2 heures. Ensuite, le mélange a été filtré sous vide à l'aide du papier filtre pour recueillir l'extrait alcoolique. Enfin, le filtrat est conservé dans un flacon hermétique à une température de 4°C, à l'abri de la lumière, afin de préserver ses propriétés (**Handa *et al.*,2008**) (**Figure 19**).



Figure 19: Montage et procédure d'extraction à reflux.

2.3- Concentration sous vide

Les trois filtrats ont été collectés puis s'évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 40° à 50° C (**Figure20**). Enfin les trois extraits obtenus ont été conservés au réfrigérateur à 4° C à l'abri de la lumière, jusqu'à leur utilisation.



Figure 20 : Evaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif.

2.4- Rendements des extractions

Le rendement d'extraction est la quantité d'extrait brut obtenu après traitement d'une plante par un solvant donné, indiquant la capacité du solvant à solubiliser les composés présents dans la matière végétale.

Le rendement en pourcentage a été calculé par la formule suivante **Pacôme et Augustin (2018)** :

$$R \% = (M_{ext}/M_{ech}) \times 100$$

Où :

R : est le rendement en pourcentage (%).

Mext : la masse de l'extrait après évaporation du solvant (g).

Méch : la masse sèche de l'échantillon végétal (g)

2.5-Screening phytochimique

2.5.1- Principe

Le criblage phytochimique qualitatif est un processus d'analyse essentiel pour déterminer la composition chimique d'une plante en termes de métabolites primaires et secondaires. Il est mis en œuvre par des tests, réalisés sur les extraits de la plante, exploitent des réactions chimiques qui conduisent soit à la formation de précipités insolubles, soit à l'apparition de complexes colorés, grâce à l'emploi de réactifs spécifiques (**Badiaga, 2011**).

Les extraits obtenus ont été évalués qualitativement pour déterminer la présence de phénols, de flavonoïdes, de tanins, de coumarines, de quinones, de terpénoïdes, de stéroïdes, d'alkaloïdes et de saponines.

2.5.2- Détection des Phénols

Quelques gouttes d'une solution de Chlorure de fer FeCl_3 à 10% sont rajoutées à 1ml de chaque extrait liquide. La réaction donne une coloration bleu-noir en présence des phénols (**Ciulci, 1994**)

2.5.3-Détection des Flavonoïdes

1ml d'hydroxyde de sodium à 10% était ajouté à 1ml d'extrait alcoolique. La présence de flavonoïdes est indiquée par la formation de couleur jaune à orange.

2.5.4- Détection des Tannins

Deux millilitres de chacun des extraits ont été dilués avec de l'eau distillée dans des tubes à essai distincts. Ensuite, 2 à 3 gouttes de chlorure ferrique à 5 % (FeCl_3) ont été ajoutées. L'apparition d'une coloration vert-noir ou bleue indique la présence de tanins (**Sangeetha et Jayaprakash, 2015**).

2.5.5- Détection des Coumarines

1 ml de 10% de l'hydroxyde de sodium a été ajouté à 1 ml d'extrait alcoolique. La présence de coumarines est indiquée par la formation de couleur jaune.

2.5.6- Détection des Quinones

1 ml d'acide sulfurique concentré a été ajouté à 1 ml d'extrait alcoolique. La présence de quinones est indiquée par la formation de la couleur rouge (Qnais *et al*, 2007).

2.5.7- Détection des Terpènes

2ml d'acide trichloracétique ont été ajoutés à 1ml d'extrait alcoolique. La présence des terpènes est confirmée par la formation d'un précipité rouge (Komaram *et al*, 2019).

2.5.8- Détection des Stéroïdes

2 ml d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés lentement sur la paroi du tube à 2 ml d'extrait. La présence de stéroïdes est indiquée par la formation de deux couches, une couche rouge et une couche inférieure vert jaunâtre (Hajoori *et al*, 2014).

2.5.9- Détection des Alcaloïdes

Test de Mayer : quelques gouttes d'un réactif de Mayer (1.35g Chlorure de mercure $HgCl_2$ + 3.95g Iodure de Potassium KI dans 100ml d'eau distillée) avec 2ml de Chlorure d'hydrogène HCl concentrée sont ajoutés à 1ml de chaque extrait liquide. L'apparition d'une précipitation blanche ou d'une coloration verte indique la présence des alcaloïdes (Hossain *et al*, 2013).

2.5.10- Détection des Saponines

5 ml de l'eau ont été ajoutés à 1 ml d'extrait alcoolique, le tube a été agité pendant 2 minutes. La présence des saponines sont indiquées par la formation de mousse. La formation de mousse stable après 15 min confirme le test (Chonoko *et Rufai*, 2011).

2.6- Dosage colorimétrique des composés phénoliques

Les dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux présents dans la résine (des trois extraits) ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre.

2.6.1-Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

Le dosage est effectué en suivant la méthode colorimétrique décrite par **Muller et al.(2010)**, qui utilise le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lors de l'oxydation des phénols, ce mélange est réduit en des oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau, 1968**). La coloration obtenue, qui est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux, est mesurée à une longueur d'onde comprise entre 725 et 750 nm (**Manon, 2022**).

- **Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé en suivant la méthode colorimétrique. Un volume de 200 μ L de l'extrait dilué a été introduit dans un tube à essai, puis, 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) et de 800 μ L de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % (p/v) sont additionnés. Le tube a été agité et incubé durant 30 min à l'abri de la lumière et à une température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide gallique est utilisé comme contrôle positif (**Akrab et Mouhadi, 2019**).

Une gamme étalon à base de l'acide gallique est également préparée à des différentes concentrations. Les teneurs en polyphénols ont été exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g extrait) (**Halla et al.,2016**).

2.6.2-Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode décrite par **Bahorun et al. (1996)** et **Djeridane et al. (2006)**.

- **Principe**

La détermination des flavonoïdes totaux repose sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Les flavonoïdes, grâce à leur groupement hydroxyle libre en position 5, peuvent former un complexe jaunâtre par chélation avec l'ion AlCl_3 . L'intensité de cette coloration jaune est proportionnelle à la concentration en flavonoïdes dans l'échantillon.

- **Mode opératoire**

Dans chaque tube à essai, on ajoute 250 µl de dilution de l'extrait, 1 ml d'eau distillée, puis 75 µl de solution de nitrite de sodium (NaNO_2 , à 0,5 %). Après un temps de réaction de 6 minutes, on ajoute 150 µl de solution d' AlCl_3 à 10 %, puis on laisse réagir pendant 5 minutes supplémentaires. Ensuite, 500 µl de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH , à 4 %) et 2,5 ml d'eau distillée sont ajoutés. Le mélange est agité. L'absorbance est ensuite mesurée à 510 nm, après 15 minutes d'incubation, contre un blanc constitué d'eau distillée.

La quercétine est utilisée comme standard. Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g extrait).

- **Expression des résultats**

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée à partir de l'équation de régression linéaire issue de la courbe d'étalonnage construite par la quercétine. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait).

2.7- Activités biologiques

Les activités biologiques ; antioxydante et antibactérienne des extraits obtenus sont également évaluées.

2.7.1- Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité anti-oxydante, des extraits de la résine de Pin d'Alep a été faite par un piégeage des radicaux libres.

- **Activité anti radicalaire du DPPH (2,2-Diphényl-1-PicrylHydrazil)**

- **Principe du DPPH**

Le DPPH (DiPhényle Picryl Hydrazyle) est une solution de couleur violette, et d'une absorbance caractéristique à 517nm (**Sanchez, 2002**). Il permet de mesurer le pouvoir d'un antioxydant tel que les composés phénoliques à réduire un radical chimique, par la disparition de la couleur initiale violette du DPPH en captant un Hydrogène puis il se réduit en 2-2-diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (**Kim et al, 2002**) (**Figure 21**).

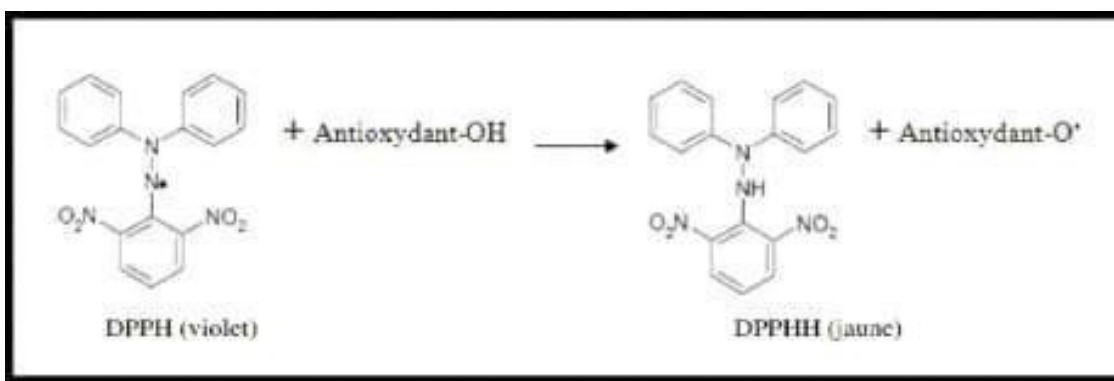


Figure 21 : Réduction du radical DPPH (Nabti *et al.*, 2023).

- **Mode opératoire**

Quatre milligrammes de DPPH ont été solubilisés dans 100ml de méthanol absolu pour avoir une solution de 0,004 %, bien agité le mélange et le conserver avec du papier Aluminium. Pour chacun des 3 extraits une gamme de dilution est préparée (100/50/25/12,5/6,75/5/4/3/2/1/0,5 µg/ml). Ensuite, 2 ml d'extrait de chaque concentration et 2 ml de la solution DPPH sont mélangés, puis agités par un vortex. Les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante, pendant 30 min.

L'absorbance a été mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre. Un contrôle négatif est préparé (Serigne *et al.*, 2017).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide ascorbique (vitamine C) (Annexe).

- **Expression des résultats**

L'effet de piégeage du radical DPPH de l'activité antioxydante, s'exprime en % d'inhibition (Dieng *et al.* 2017), Selon l'équation suivante :

$$PI = 100 \times (A0 - A1) / A0$$

Où :

PI : Pourcentage d'Inhibition ;

A0 : Absorbance du contrôle négatif ;

A1 : Absorbance de l'échantillon.

- **Calcul des IC50**

IC50, concentration inhibitrice à 50 %, est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC50 sont calculées par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (Torres *et al.*, 2006).

2.7.2-Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion en puits sur un milieu gélosé, pour déterminer parmi nos extraits ceux qui ont une inhibition microbienne (Balouiri *et al.*, 2016).

❖ L'évaluation de l'activité antibactérienne

• Bactéries testées

Les souches bactériennes utilisées sont quatre à Gram positif et Gram négatif de référence (Tableau 01).

Tableau 01 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

<i>Bactéries</i>	<i>Souches</i>	<i>Code</i>	<i>Gram</i>
<i>Bacille</i>	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 87 39	Négatif
	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	NCIMB 86 26	Négatif
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 66 33	Positif
<i>Cocci</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 65 38	Positif

• Préparation des solutions des extraits

Les extraits ont été dilués dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO) pour préparer une solution mère de chaque extrait (700mg/ml).

• Préparation des cultures

Chaque souche bactérienne a été repiquée dans milieu gélose nutritive par la méthode des stries, puis incubée à 37C° pendant 18 à 24 heures pour obtenir des colonies jeune et pure.

- **Préparation de l'inoculum**

À l'aide d'une pipette pasteur stérile quelques colonies bien isolées sont prélevées et mises dans l'eau physiologique stérile (0,9%) afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente à 0,5 Mac Farland.

- **Ensemencement et perforation des puits**

Utilisant la méthode des puits sur gélose, Des suspensions bactériennes standardisées ont été étalées par 3 séries sérés à l'aide d'un écouvillon stérile sur la surface de milieu Mueller-Hinton préalablement solidifié. Des puits ont été percés dans la gélose. Chaque puits a été rempli avec 50 μ L de l'extrait de la résine. Un puits témoin négatif a été réservé au solvant de l'extrait (DMSO). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. Chaque teste a été répétée deux fois. L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des puits, exprimé en millimètres (Balouiri *et al.*,2016) (Figure 22).

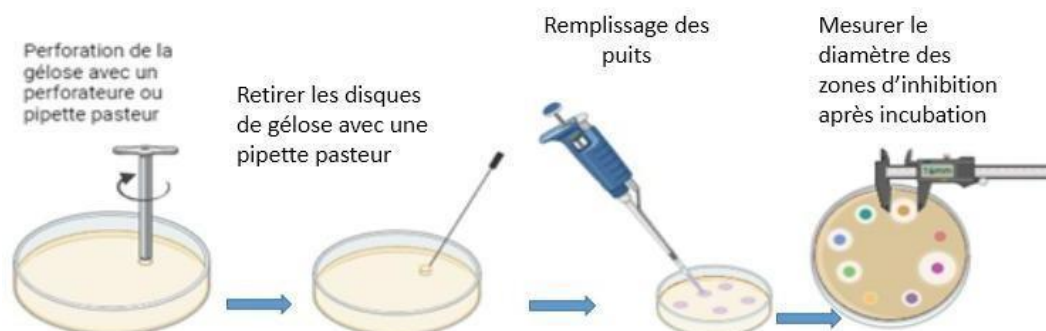


Figure 22 : Etapes de la méthode des puits sur gélose.

- **Détermination de la CMI**

- **Définition**

La CMI ou la concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber visiblement la croissance bactérienne (OMS ,2023). Elle est déterminée par des méthodes normalisées comme la diffusion en milieu liquide ou la diffusion sur gélose (CLSI,2022).

▪ Mode opératoire

A partir de la solution mère de chaque extrait qui a étaient préparés précédemment, des séries de dilutions avec des différentes concentrations ont été préparées (700 /600 /500 /200/ 150/ 100/ 50/ 20/ 10/ 5 /2,5mg/ml) (**Figure 23**).

Après ensemencement des suspensions bactériennes à la surface des boîtes de Pétri, des puits ont été établis dans le milieu de culture. Un volume de 50 μ L de chaque concentration d'extrait a été déposé. Chaque concentration a été testée en double. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures.

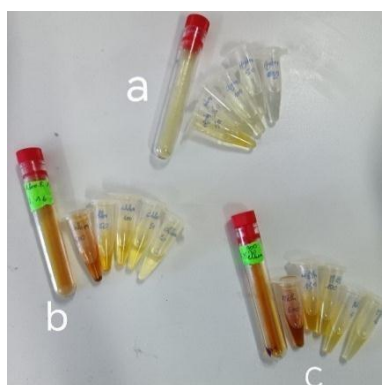


Figure 23 : Préparation des dilutions d'extraits étudiés ; **a** : extrait hydro-éthanolique ; **b** : extrait chloroformique ; **c** : extrait méthanolique.

❖ *L'évaluation de l'activité antifongique*

• Souches fongiques testées

Les souches fongiques testées comprennent une levure *Candida albicans* et deux champignons : *Fusarium sp.* et *Aspergillus niger*. (**Tableau 02**).

Tableau02 : Caractéristiques de la souche fongique utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique.

Souches	Code
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

- **Mode opératoire**

Dans des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé (Sabouraud), préalablement ensemencé par écouvillonnage avec une suspension fongique. Des puits sont ensuite creusés dans le milieu à l'aide d'une pipette Pasteur, chacun étant rempli d'un volume précis de la solution à tester. Après incubation à une température adaptée autour de 28 à 30°C pendant 48 à 72 heures, l'activité antifongique est déterminée par la mesure du diamètre d'inhibition autour des puits, indiquant la zone où la croissance fongique est empêchée (CLSI,2008).

Résultats et discussion

1- Rendement d'extraction de la résine

Dans cette étude, nous nous intéressons à l'extraction et à l'évaluation des métabolites bioactifs présents dans la résine de Pin d'Alep, en utilisant trois solvants différents (méthanol, hydro-éthanol et chloroforme), afin d'optimiser le rendement et de comparer la richesse en composés d'intérêt de chaque extrait. Les méthodes d'extraction employées : la macération et l'extraction sous reflux. Ces techniques ont permis d'isoler divers métabolites bioactifs. Le **Tableau 03** indique les rendements des trois extraits étudiés.

Tableau 03: Rendement des extraits de résine de Pin d'Alep

Extraits de la résine de Pin d'Alep		
Méthanolique	Hydro-éthanolique	Chloroformique
88,6%	79,4%	86,1%

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus, les rendements d'extraction des trois extraits sont relativement similaires. L'extrait méthanolique présente le rendement le plus élevé (88,6 %), suivi de l'extrait chloroformique (86,1 %), puis de l'extrait hydro-éthanolique, qui présente un rendement de 79,4 %.

Dans la littérature, notre rendement de l'extrait méthanolique est supérieur à celui rapporté par Araba *et al.*, (2023) qui ont estimé un rendement de 73,23 %. Le rendement élevé obtenu par ce solvant s'explique probablement par la forte polarité du méthanol, qui favorise la solubilisation d'un large éventail de composés bioactifs (Zermane *et al.*,2022 ; Belkcem *et al.*,2023).

Nos résultats obtenus pour l'extrait chloroformique sont conformes à ceux donnés par Mostfai (2024) qui ont obtenu un rendement de 81.5%. Ainsi, le chloroforme a également montré un rendement élevé, probablement en raison de sa capacité à extraire efficacement les composés lipophiles présentés dans la résine (Ben houhou *et al.*,2021 ; Bouguerra *et al.* (2022), Messaoudi *et al.* (2023).

L'extrait hydro-éthanolique présente un rendement d'extraction inférieur à celui des deux autres extraits, bien qu'il soit généralement utilisé pour l'extraction des composés polaires et semi-polaires, en raison de la nature mixte de son solvant (eau/éthanol) (**Benmoussa *et al.*, 2022**).


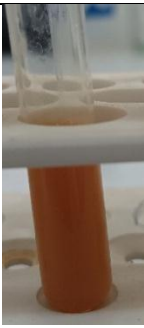

La variation de rendement des trois extraits dépend de plusieurs facteurs tel que le temps d'extraction, la température, ainsi que la localisation géographique, la période de récolte, le climat et la durée de stockage (**Su *et al.*, 2006**). Aussi dépend de nature du solvant utilisé (**Zhao *et al.*, 2006**) et la méthode d'extraction appliquée (**Wojdylo *et al.*, 2007**).



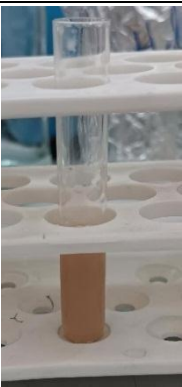








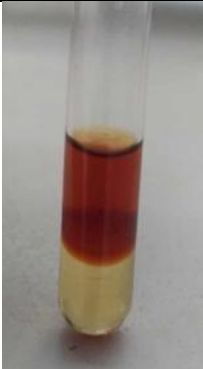
2- Screening phytochimique













Les tests de screening phytochimiques ont été réalisés sur les trois extraits (extrait méthanolique, extrait hydro-éthanolique et extrait chloroformique,) préparés à partir de résine de Pin d'Alep. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitations ou de coloration par des réactifs spécifiques.

Les résultats de ce criblage sont reportés dans le **Tableau 04**, qui révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolite secondaire.

Tableau 04 : Résultats de screening phytochimique de la résine de Pin d'Alep.

Métabolite secondaire	Extrait méthanolique	Extrait hydro-éthanolique	Extrait chloroformique	Résultat positif attendu
Flavonoïdes	 +	 +	 +	Présence de coloration jaune.

Tannins	 -	 -	 -	- Présence de coloration vert-noir ou bleue.
Phénols	 -	 -	 -	Présence de coloration bleu-noir.
Quinones	 +	 +	 +	Présence de coloration rouge .
Stéroïdes	 +	 -	 +	Formation de deux couches, une couche rouge et une couche inférieure vert jaunâtre.

Alcaloïdes	 +	 -	 +	L'apparition d'une précipitation blanche.
Saponines	 -	 -	 -	Formation de mousse.
Terpènes	 +	 -	 -	Formation d'un précipité rouge.
Coumarines	 +	 +	 +	Présence de coloration jaune.

(+) test positif ; (-) test négatif

Le criblage phytochimique de la résine de Pin d'Alep révèle une composition variable selon la polarité du solvant utilisé. D'après les résultats présentés, l'extrait méthanolique de la résine contient un large spectre de métabolites, notamment des flavonoïdes, des quinones, des stéroïdes, des alcaloïdes, des terpènes et des coumarines. En revanche, les tanins, les phénols et les saponines sont absents.

L'extrait méthanolique, en raison de la forte polarité du méthanol, permet l'extraction de plusieurs composés bioactifs. Selon plusieurs auteurs, il est particulièrement efficace pour extraire les flavonoïdes et les tanins (**Bouguedoura *et al.*, 2019 ; Djellouli *et al.*, 2020**), ainsi que les stéroïdes, les triterpènes et les quinones (**Boudjelal *et al.*, 2015 ; Benhouhou *et al.*, 2018**). En revanche, les saponines et les alcaloïdes y sont généralement absents ou présents en très faible quantité (**Djeridane *et al.*, 2006 ; Chemsal *et al.*, 2017**).

L'extrait hydro-éthanolique n'a révélé que la présence des flavonoïdes, des quinones et des coumarines, tandis que les autres métabolites recherchés étaient absents. De même selon la littérature, l'extrait hydro-éthanolique, légèrement moins polaire, montre une richesse en flavonoïdes, tanins, quinones, stéroïdes et triterpènes (**Boudjelal *et al.*, 2015 ; Kheyar-Kraouche *et al.*, 2020**), et absence en saponines et alcaloïdes (**Djeridane *et al.*, 2006 ; Chemsal *et al.*, 2017**).

Quant à l'extrait chloroformique, plusieurs métabolites ont été détectés, notamment des flavonoïdes, des quinones, des stéroïdes, des alcaloïdes ainsi que des coumarines. L'étude effectuée par **Mostfai (2024)** concernant l'extraction de Pin d'Alep, par reflux au chloroforme, confirment nos résultats qualitatifs. En effet, en raison de sa nature peu polaire, cet extrait se distingue par une forte teneur en stéroïdes, triterpènes et certaines quinones, tandis que des composés polaires tels que les flavonoïdes, les tanins et les saponines y sont faiblement présents, voire absents (**Djeridane *et al.*, 2006 ; Benhouhou *et al.*, 2018**).

L'extrait méthanolique (polaire) est particulièrement efficace pour extraire des composés hydrophiles tels que les flavonoïdes, les tanins et les autres phénols. En outre, l'extrait hydro-éthanolique, de polarité intermédiaire, permet de solubiliser principalement les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins et certaines coumarines présents dans la résine. En revanche l'extrait chloroformique de

nature apolaire solubilise préférentiellement les composés lipophiles comme les triterpènes et les stéroïdes.

D'après nos résultats, on peut conclure que les extraits méthanolique et chloroformique sont les plus riches en métabolites secondaires, qu'ils soient polaires ou apolaires. En revanche, l'extrait hydro-éthanolique présente la plus faible diversité des métabolites secondaires.

3- Dosage colorimétrique des composés phénoliques

Pour mesurer les composés phénoliques, deux analyses ont été réalisées. Les polyphénols totaux ont été quantifiés par la méthode de Folin-Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme référence. Ensuite, la teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée avec le trichlorure d'aluminium, en utilisant la quercétine comme standard.

3.1-Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux dans les extraits : méthanolique, hydro- éthanolique et chloroformique, de résine de Pin d'Alep a été calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ; **$Y = 0,0032x$ avec $R^2 = 0,9887$ (Figure 24).**

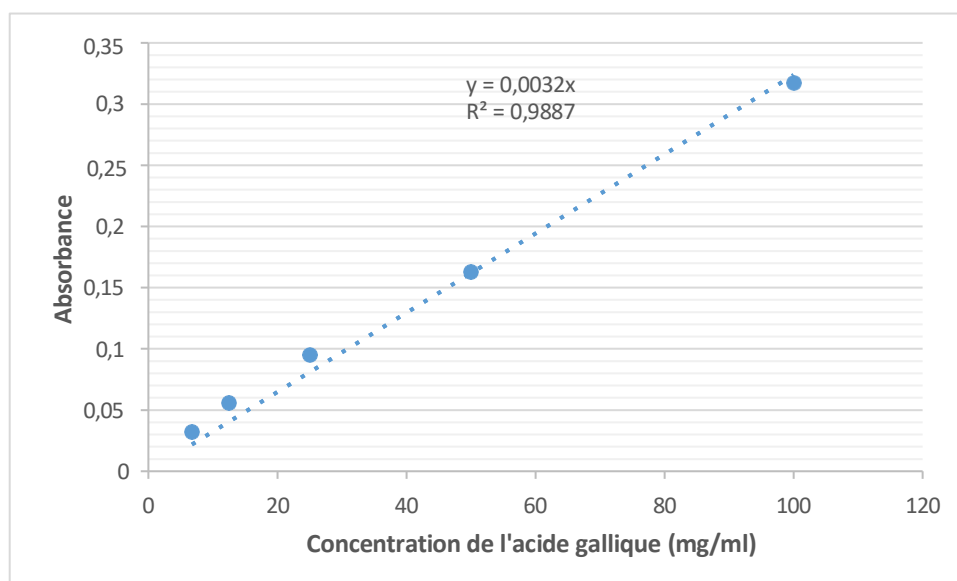


Figure 24 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique ($\lambda=765$ nm).

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g extrait) (**Tableau05**).

Tableau 05 : Teneur en phénols totaux dans les trois extraits de Pin d'Alep.

Echantillon dosé	Teneurs en phénols totaux (mg équivalente d'acide gallique/g extrait)
Extrait méthanolique	79,53
Extrait hydro-éthanolique	176,875
Extrait chloroformique	103,59

D'après nos résultats on trouve que l'extrait hydro-éthanolique de la résine de Pin présente la teneur en phénols totaux la plus élevée avec 176.875 (mg EAG/g). Ainsi, l'extrait chloroformique montre une forte teneur de composés phénoliques, 103.59 (mg EAG/ g), tandis que l'extrait méthanolique affiche la plus faible entre eux en composés phénoliques 79.53 (mg EAG/ g d'extrait).

Nos résultats indiquent que l'extraction à l'aide d'un mélange hydro-éthanolique est la plus efficace pour extraire les composés phénoliques cela est notamment dû à la solubilité des divers types des polyphénols d'un solvant à un autre, L'éthanol est fréquemment privilégié dans l'industrie agroalimentaire pour l'extraction de composés bioactifs en raison de sa moindre toxicité par rapport aux autres solvants (méthanol et chloroforme) (**Cacace et Mazza, 2003 ; Franco et al., 2008**).

Ainsi, les résultats de l'extraction chloroformique de la résine présente une bonne teneur en polyphénols, proche des résultats obtenus par **Mostfai (2024)**, qui a également utilisé une extraction par reflux au chloroforme et a rapporté une teneur plus élevée, estimée à 690,17 mg EAG/g.

L'extraction métanolique montre la plus faible teneur en composés phénolique. Notre résultat rapproche de celui rapporté par **Entrouissi (2019)**, qui a observé une teneur totale en polyphénols de 92 mg EAG/g d'extrait. L'extrait méthanolique présente donc, une teneur plus faible pour plusieurs raisons liées à la polarité du solvant vis-à-vis notre échantillon (lipophile).

3.2- Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits, méthanolique et hydro- éthanolique et chloroformique de la résine de Pin d'Alep a été calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de la quercétine ; $Y = 0,0079x$ avec $R^2=0,9853$ (Figure 25).

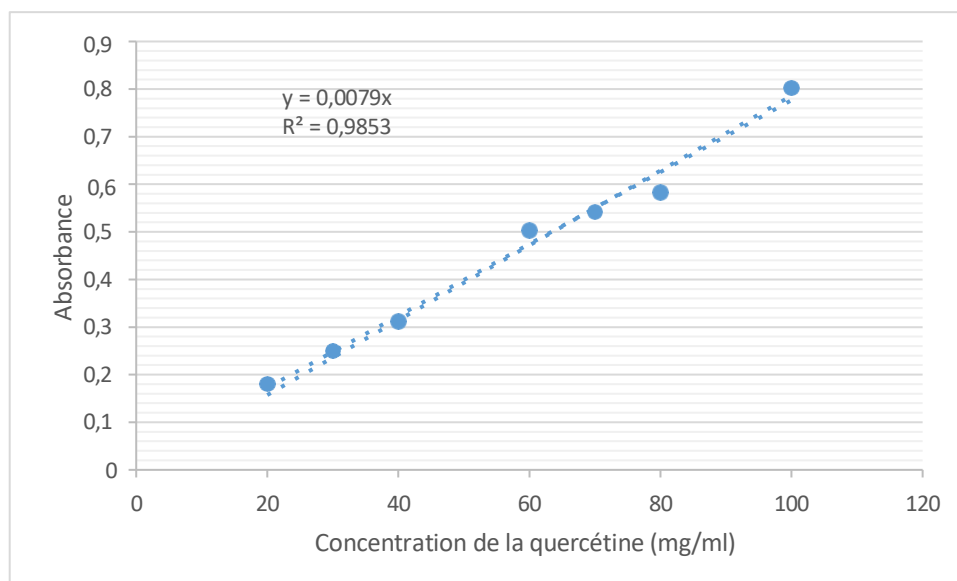


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la quercétine ($\lambda = 510$).

Les résultats obtenus, exprimés en mg équivalent de quercétine par g de l'extrait (mg EQ/g extrait), sont présentés dans le **Tableau 06**.

Tableau 06 : Teneur en flavonoïdes dans les trois extraits de la résine de Pin.

Echantillon dose	Teneur en flavonoïdes (mg Equivalent Quercétine /g d'extraits)
Extrait méthanolique	40,5
Extrait hydro-éthanolique	50,88
Extrait chloroformique	60

Les résultats obtenus montrent que l'extrait chloroformique de la résine de Pin d'Alep se révèle être le plus efficace pour l'extraction des flavonoïdes affichant la teneur la

plus élevée avec 60 (mg EQ /g Extrait), Alors que l'extrait hydro-éthanolique présente une efficacité intermédiaire avec 50,88 (mg EQ/g Extrait). En revanche, l'extrait méthanolique est moins performant, ne contenant que 40,5 (mg EQ/g Extrait).

Selon les travaux réalisés, **Mostfai (2024)** a rapporté une teneur en flavonoïdes nettement plus élevée pour l'extrait chloroformique de la résine de Pin d'Alep, atteignant 108,46 mg EQ/g d'extrait.

Par ailleurs, **Djebbari et al. (2020)**, ont rapporté une teneur plus faible de $14,75 \pm 0,42$ mg EQ/g utilisant une extraction hydro-éthanolique de Pin. De même, **Ben Mansour et al. (2019)**, estiment une teneur moins élevée, $11,32 \pm 0,85$ mg EQ/g, d'un extrait méthanolique de même échantillon.

Les différences entre les résultats montrent que la teneur en flavonoïdes dépend non seulement de la polarité du solvant mais de l'origine géographique, de la saison de collecte et du mode de préparation de la résine (**Bouzenna et al.,2017 ; Ben Mansour et al.,2019**).

De cette analyse on conclut donc que la majorité des flavonoïdes présents dans la résine de Pin d'Alep sont peu polaires, probablement sous forme aglycone, et sont donc mieux extraits par des solvants peu polaires comme le chloroforme. Le méthanol, solvant très polaire, semble moins efficace pour extraire ces composés, ce qui justifie sa faible teneur en flavonoïdes (**Mostfai, 2024 ; Djebbari et al., 2020**).

4- Activités biologiques

4.1- Activité antioxydante

Dans ce test nous avons utilisé la méthode DPPH pour déterminer l'activité antioxydante des extraits des résines de Pin d'Alep.

Les résultats obtenus nous ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de concentrations des extraits (**Figures 26,27,28**).

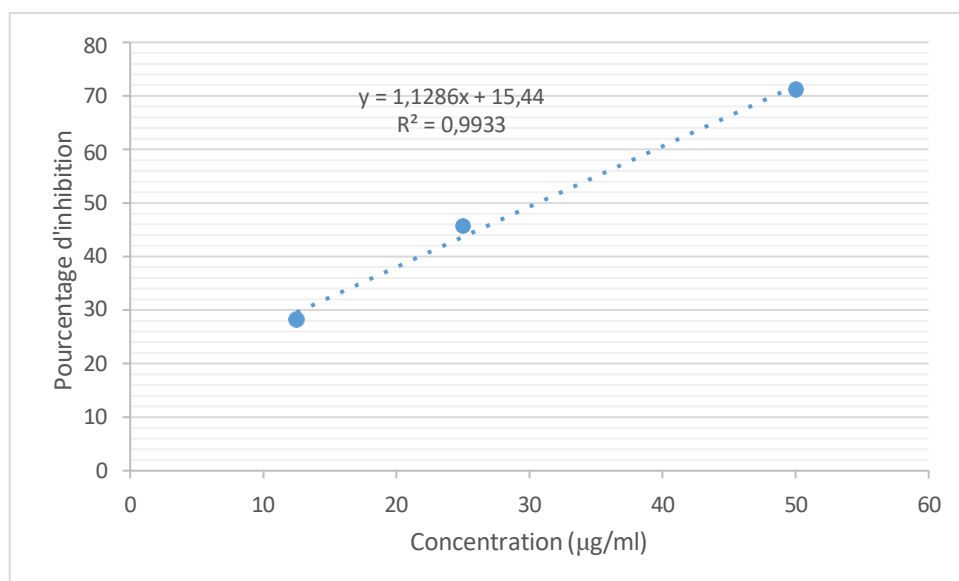


Figure 26 : Courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la Concentration d'extrait méthanolique de la résine de Pin d'Alep.

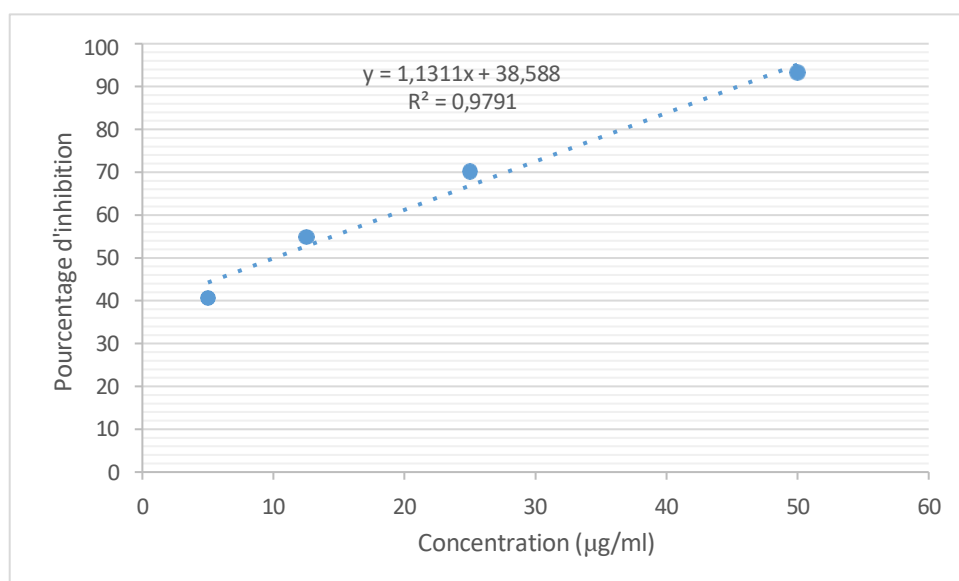


Figure 27 : Courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la Concentration d'extrait hydro-éthanolique de la résine de Pin d'Alep.

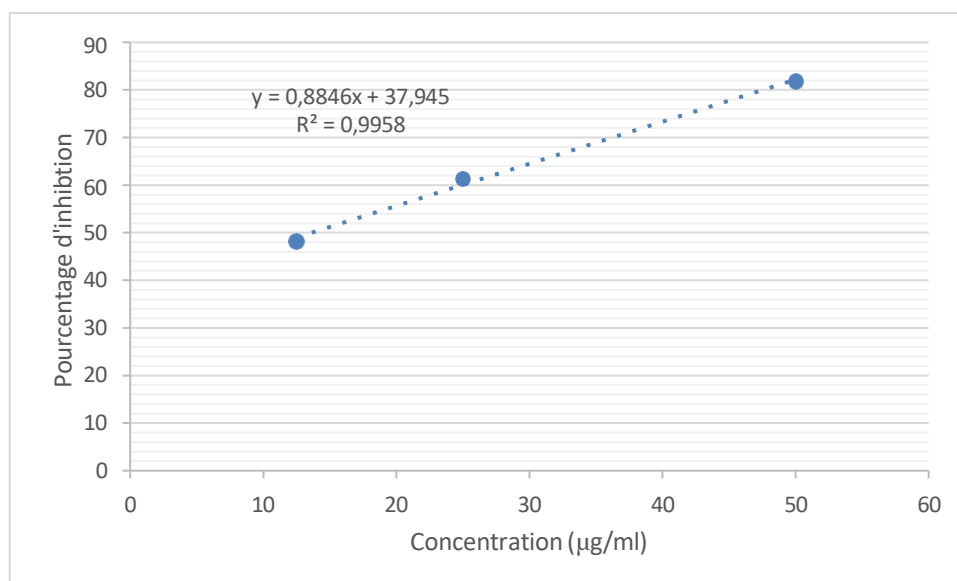


Figure 28 : Courbe des pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction de la Concentration d'extrait chloroformique de la résine de Pin d'Alep.

A partir de la courbe de pourcentage d'inhibition de DPPH, les valeurs de l'IC50 sont déterminées (**Tableau 07**). Cette dernière est définie comme étant la concentration du substrat nécessaire à diminuer 50% d'absorbance de la solution initiale du DPPH.

Tableau 07 : Les valeurs d'IC50 déterminées par le piégeage du radicale DPPH.

Echantillons dosés	Valeurs d'IC50 (µg/ml)
Extrait méthanolique	30,62
Extrait hydro-éthanolique	10,08
Extrait chloroformique	13,62
Acide ascorpique (vitamine C)	3,41

D'après nos résultats montrés dans le **Tableau 07**, les valeurs d'IC50 mesurées indiquent l'efficacité antioxydante des différents extraits testés ainsi l'acide ascorbique utilisé comme standard. L'extrait hydro-éthanolique qui a donné une forte activité d'une IC50 de 10.08 (µg/ml), suivi par l'extrait chloroformique qui a donné une IC50 égale à 13.62 (µg/ml), terminant par l'extrait méthanolique qui a révélé une activité plus faible avec une IC50 de 30.62 (µg/ml), traduisant une moindre efficacité antioxydant.

En comparant les différents extraits, les extraits chloroformique et hydro-éthanolique se sont révélés nettement plus efficaces que l'extrait méthanolique.

Nos extraits montrent un effet antioxydant plus fort que les résultats de l'extrait aqueux lyophilisé présenté par **Sousen *et al* (2021)** de la résine de Pin avec une valeur d'IC₅₀ 83,64 µg/ml.

L'efficacité antioxydante supérieure de l'extrait chloroformique et hydro-éthanolique peut être attribuée à leur forte teneur en composés phénoliques. Par ailleurs, les travaux de **Aloui *et al* (2022)** ont montré que cette activité dépend non seulement de la concentration en composés phénoliques, aussi à leur structure chimique et de la disponibilité en groupements hydroxyles (OH) qui leur attribue la capacité de transférer des électrons ou de donner des hydrogènes.




4.2- Activité antimicrobienne





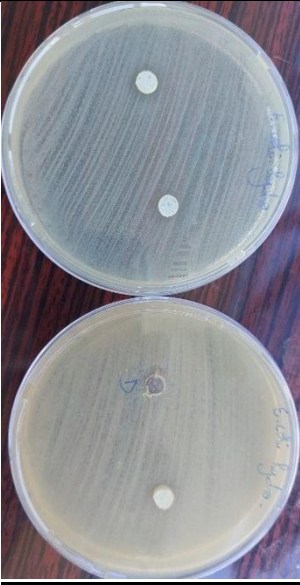

4.2.1- Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne se traduit par une zone d'inhibition environnante des puits par les extraits étudiés de la résine de Pin d'Alep, à la concentration (700 mg/ml).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de nos extraits a été faite sur quatre bactéries (*E. coli* / *S. aureus* / *P. aeruginosa* / *B. subtilis*). Les résultats de l'activité antibactérienne des trois extraits de la résine sont regroupés dans le **Tableau 08**.

Tableau 08 : Zones d'inhibition de la résine de Pin d'Alep d'extrait méthanolique, extrait hydro-éthanolique extrait chloroformique, et DMSO (Témoin) ; sur les quatre souches bactériennes.

Bactéries	Extrait méthanolique	Extrait hydro-éthanolique	Extrait chloroformique
<i>Bacillus subtilis</i>			

<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Escherichia coli</i>			



D : DMSO (Diméthylsulfoxyde) témoins négatif.

Les résultats obtenus montrent que l'activité antimicrobienne des extraits testés est sélective et ne s'exerce que contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, alors que contre *E. coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC sont révélées résistantes à tous les extraits.

Cette observation suggère que les composés présents dans les extraits possèdent une spécificité d'action limitée aux bactéries à Gram positif comme *S.aureus* ce qui cohérent avec les résultats de **Turkmen et al. (2007)** et **Hammami et al. (2022)** ou les extraits des plantes obtenues par macération présentent souvent une activité contre les staphylocoques que contre d'autres genres bactériens à Gram négatif, généralement plus résistants en raison de la structure de leur membrane externe (**Georgantelis et al., 2007**).

4.2.2-Détermination de la CMI

La CMI est la plus faible concentration d'un agent antimicrobien qui inhibe toute croissance visible dans un micro-organisme. Les trois extraits étudiés ont été testés sur *Staphylococcus aureus*. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en tenant compte du diamètre du puits (**Tableau 09**).

Tableau 09 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par extrait méthanolique, extrait hydro-éthanolique et extrait chloroformique, et DMSO contre *Staphylococcus aureus*.

Extraits	Concentrations (mg/ml)	Souche bactérienne et diamètre d'inhibition
		<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Extrait méthanolique</i>	700	12±0,35
	500	11±0,70

	150	10±0,70
	100	10±0,53
	50	9±0,35
	20	8±0,53
	10	8±0,17
	5	7±0,17
	2,5	00±00
<i>Extrait hydro-éthanolique</i>	600	12±0,70
	500	11±0,70
	150	10±0,10
	100	9±0,15
	50	9±0,32
	20	8±0,21
	10	7±0,35
	5	7±0,28
	2,5	00±00
<i>Extrait chloroformique</i>	700	13±0,70
	500	11±0,35
	150	10±0,17
	100	9±0,35
	50	8±0,70
	20	7±0,53
	10	7±0,35
	5	7±0,49
	2,5	00±00
	DMSO (20µl)	00±00

Selon le **Tableau 09** les trois extraits ont montrés une zone d'inhibition significative d'environ de 13mm de *S.aureus* la concentration 700mg/ml. Ces résultats s'expliquent par la richesse de la résine de Pin d'Alep en composés phénoliques.

Selon **Shan et al (2007)** et **Falleh et al (2008)** plusieurs classes de polyphénols, telles que les acides phénoliques ont été rapportées comme jouant un rôle de mécanisme de

Défense chez les plantes contre les micro-organismes, les insectes et les herbivores pathogènes. Elles agissent également comme des substances antibactériennes importantes. Cette hypersensibilité peut s'expliquer par la sensibilité des Gram positif aux changements environnementaux externes, tels que la température et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (**Balentine et al., 2006**).




D'autres composés présents dans la résine de Pin d'Alep, tels que les terpènes, les alcaloïdes, les stéroïdes et certaines quinones, ont également montré une activité antibactérienne (**Haichour et al., 2020**).

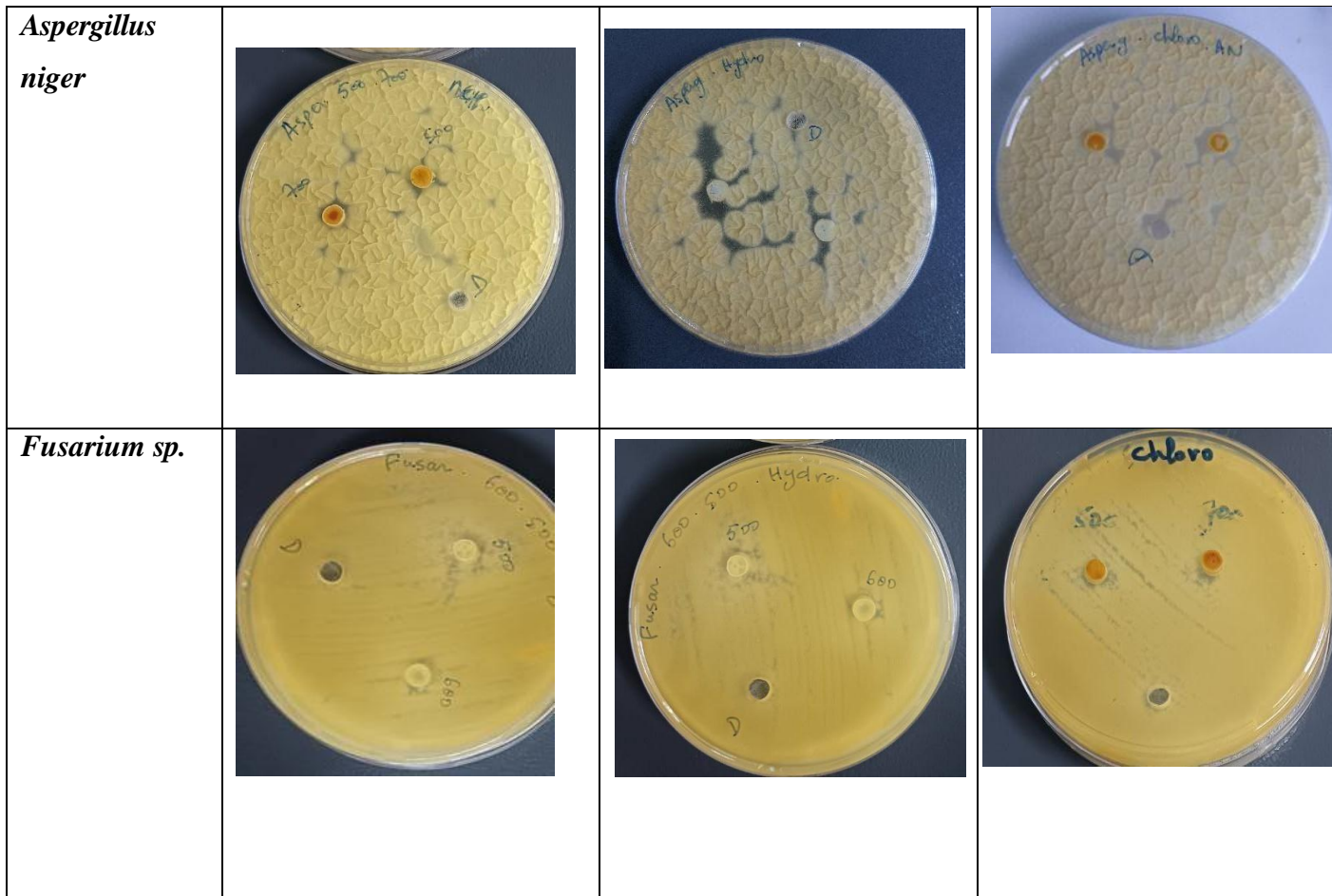
D'autre part la CMI des trois extraits de résine de Pin d'Alep contre *Staphylococcus aureus* est estimée à la concentration de 5mg/ml (**Tableau 10**). Cela signifie qu'au-delà de cette concentration, tous les extraits inhibent visiblement la croissance bactérienne.

4.2.3-Activités antifongiques

L'activité antifongique se traduit par une zone d'inhibition environnante des puits par les extraits étudiés de la résine de Pin d'Alep, à la concentration (200 mg/ml). L'évaluation de l'activité antifongique de nos extraits a été faite sur trois champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium. Sp*). Les résultats de l'activité antifongique des trois extraits de la résine sont regroupés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Zones d'inhibition de la résine de Pin d'Alep d'extrait méthanolique, extrait hydro-éthanolique, extrait chloroformique et DMSO (Témoin) ; sur les souches fongiques.

Champignons	Extrait méthanolique	Extrait hydro-éthanolique	Extrait chloroformique
<i>Candida albicans</i>			



D : DMSO (Diméthylsulfoxyde) témoins négatif.

Une croissance fongique a été observée (**Tableau 10**) pour les trois souches de champignons testées lorsqu'elles sont exposées aux trois extraits étudiés. Ce qui indique une absence d'activité antifongique.

L'absence de l'inhibition peut être attribuée à plusieurs facteurs, peut-être que les champignons utilisés sont très résistants contre la résine de Pin d'Alep utilisé, bien que la diffusion limitée des composés actifs dans les milieux de culture peut sous-estimer l'activité réelle des extraits, car certains extraits très actifs peuvent présenter de faibles zones d'inhibition dues à une mauvaise diffusion (**Maloba et al., 2025**).

Conclusion et perspectives

De nos jours, la phytothérapie, qui consiste à utiliser les plantes médicinales à des fins préventives ou curatives, connaît un regain d'intérêt considérable dans la recherche biomédicale. Ce domaine à l'interface entre la médecine traditionnelle et la science moderne, valorise les substances naturelles sues des végétaux, reconnues pour leurs vertus thérapeutiques et leur faible toxicité.

Les plantes médicinales constituent ainsi une source inépuisable de composés bioactifs, offrant des alternatives intéressantes aux médicaments de synthèse, souvent associés à des effets secondaires indésirables.

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre étude, centrée sur l'analyse de la résine de Pin d'Alep, une substance largement utilisée en médecine traditionnelle méditerranéenne.

L'objectif de ce travail était de rechercher les composés naturels présents dans cette résine à partir de trois extraits: méthanolique, hydro-éthanolique « par macération » et chloroformique « par extraction à reflux », ainsi d'évaluer leurs activités biologiques, et de comparer leur efficacité en fonction du solvant utilisé.

Il est à noter que la résine est de nature lipophile, ce qui signifie qu'elle est mieux soluble dans les solvants organiques non polaires ou faiblement polaires. L'extraction par macération permet de récupérer en douceur les composés sensibles à la chaleur présents dans la résine, tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques. En revanche, l'extraction par reflux s'avère particulièrement adaptée à la résine de Pin d'Alep, car elle favorise l'extraction des composés peu polaires, comme les terpènes et les stéroïdes, grâce à l'action combinée de la chaleur et du solvant.

La détermination du rendement des extraits méthanolique, hydro-éthanolique et chloroformique a montré des résultats relativement similaires, 88.6%, 79.4%, 86.1%, respectivement. La différence de polarité de ces trois solvants favorise la solubilisation d'un large éventail de composés bioactifs.

L'analyse phytochimique réalisée sur les extraits de résine de Pin d'Alep a révélé la présence de divers composés chimiques. Les extraits méthanolique et chloroformique présentent une large gamme de composés bioactifs, tandis que l'extrait hydro-éthanolique contient un nombre plus restreint. Toutefois, les trois extraits ont révélé en commun la présence de flavonoïdes, de quinones et de coumarines. Ce test demeure

qualitatif et ne permet pas une caractérisation détaillée des constituants chimiques de la résine.

Concernant les résultats de la recherche quantitative de teneur des composés phénoliques, l'extraction à l'aide d'un mélange hydro-éthanolique semble la plus efficace pour extraire les composés phénoliques (**176,87 mg EAG/ g**). Cela est notamment dû à la polarité intermédiaire de ce solvant, qui permet une meilleure solubilisation des polyphénols, en particulier ceux présentant à la fois des propriétés hydrophiles et lipophiles. Par ailleurs, des teneurs élevées en flavonoïdes ont été observées dans l'extrait chloroformique (**60 mg EQ/g**). Cela suggère que la majorité des flavonoïdes présents dans la résine de Pin d'Alep sont peu polaires, probablement sous forme aglycone.

La détermination de l'activité antioxydante par le test de piégeage du radical DPPH a révélé que les extraits hydro-éthanolique et chloroformique présentaient une très bonne activité, avec des valeurs **d'IC50** de **10,08 µg/ml** et **13,62 µg/ml** respectivement, comparables à celle du standard. L'efficacité antioxydante supérieure de ces extraits peut être attribuée à leur forte teneur en composés phénoliques. Ce qui confirme nos résultats des dosages colorimétriques.

L'activité antibactérienne des trois extraits de la résine de Pin d'Alep *vis-à-vis* quatre souches bactériennes, a enregistré une sensibilité uniquement sur *Staphylococcus aureus* par contre, les autres souches testées (*E.coli*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*) ont montré une bonne résistance contre nos échantillons testés. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour les trois extraits révélant (**5 mg/ml**). Concernant l'activité antifongique, aucune activité n'a été détectée pour les extraits de résine.

De cette étude, il ressort que les meilleurs solvants pour l'extraction des différents composés bioactifs de la résine de Pin d'Alep sont l'hydro-éthanol (macération) et le chloroforme (à reflux).

D'autres études plus approfondies seraient souhaitable, afin d'élargir notre étude, donc les perspectives envisageables:

- Il serait pertinent de quantifier, d'isoler et de caractériser d'autres composés bioactifs responsables des activités observées, notamment les terpénoïdes, afin d'élucider leurs mécanismes d'action.
- Optimiser d'autres méthodes d'extraction.
- Faire autres types d'extraction, notamment celle des huiles essentielles, afin de mieux caractériser les composés volatils présents dans la résine.
- Faire une évaluation *in vitro* et *in vivo* des activités biologiques telles que : activités inflammatoires.

Références bibliographiques

A

- **Adouane S. (2016).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Thèse de magistère : Sciences Agronomiques. Université Mohamed Khider- Biskra <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297878/document>
- **Alexopoulos J. et Mims C.W. (1979).** Subdivision Zygomycotina. En. *Introductory Mycology. John Wiley and sons New York.* p : 228.
- **Aliouat A. et Boulkelia N. (2012).** Activité antioxydant des extraits des graines de la plante *Nigelle sativa* L, Diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé : Université de Constantine,p : 70.
- **Ammari M. et Mechouche K. (2017).** Contribution à l'étude des activités biologiques de la résine de *Pinus halpensis* Mill. Mémoire de Master 2 : Pharmacologie moléculaire. Université A. Mira-Béjaïa,p: 11.
- **Asidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K. M. and Latha L. Y. (2011).** Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), p: 1–10. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>
- **Azwanida N. N. (2015).** A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*, 4(3), p: 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>

B

- **Bahorun T., Gressier B., Troitin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin, M., Cazin J. C. and Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Journal Article*.46(11), p:1086-1089.
- **Balouiri M., Sadiki M. and Ibensouda S. K. (2016).** Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), p: 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- **Belgacem m. and Hemideche Z. (2023).** Métabolites secondaires, potentiel biologique de *Pituranthos* à balai et toxicité respiratoire d'Armoise des champs. Mémoire de mastrer. Tébessa : Biochimie Appliquée. Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi.

- **Belkacem, H., Ait-Ahmed, F., & Bensalem, B. (2023).** *Étude des rendements d'extraction des extraits végétaux par solvants polaires et apolaires. Revue Algérienne de Chimie*, 15(2), 123–135. <https://doi.org/10.xxxx/rac.2023.15.2.123>
- **Benabied n., Souaadi a. and Kadjoudj m. (2022).** Contribution à l'étude des métabolites secondaires et leurs activités biologiques de *Salvia officinalis* L. Mémoire de master. MILA : Biotechnologie Végétale. Université Abdelhafid BOUSSOUF.
- **Benarba B. (2015).** Use of medicinal plants by breast cancer patients in Algeria. *EXCLI Journal*, 14, p : 1164-1166. <https://doi.org/10.17179/excli2015-571>.
- **Benhouhou A., Benyahia A. and Kada S. (2018).** Chemical investigation of *Pinus halepensis* resin extracts and biological activities. *Journal of Applied Research in Medicinal and Aromatic Plants*, 10, p: 45–52.
- **Ben Mansour H., Boukhris M., Amri Z., Mekki M. and Sayadi S. (2019).** Phytochemical screening and antioxidant activity of *Pinus halepensis* Mill. resin extracts. *Industrial Crops and Products*, 131, p : 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.002>
- **Ben Moussa MT.** Département de pharmacie université de Batna. Les tanins, 2
- **Bennett R. N. and Wallsgrove R. M. (1994).** Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), p: 617-633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed., 2, Springer. (2005).
- **Benmoussa R. (2022).** Utilisation de l'éthanol et des solvants mixtes dans l'extraction des bioactifs végétaux. *Revue Biochimie et Pharmacognosie*.
- **Benyoucef, M., Bensouici, C., & Aoues, A. (2017).** Antibacterial activity of Algerian *Pinus halepensis* Mill. resin extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(3), 159–164.
- **Berkmen M. a. (2016).** Small things considered about How Did *E. coli* get named K-12
- **Bernard-Dagan C. (1988).** Les substances de réserve du Pin maritime: Rôle éventuel des métabolites secondaires. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques* ,135, p : 2540.
- **Bisset N. G. and Wichtl M. (2001).** Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals (2nd ed.). Medpharm Scientific Publishers.
- **Botton b., breton a., fevra m., gautider s., guy ph., larpent j.p., reymond p., sanglier j.j., v ayssiery y. et veau p. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Paris : Edition Masson, 11(108), p : 215- 220.

- Boudjedjou L., Nadjemi B. and Belhamel K. (2020).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *Pinus halepensis* Mill. *Revue des Bioressources*, 10(1), p: 25-34.
- **Boudjelal A., Henchiri C., Siracusa L., Smeriglio A. and Barreca, D. (2015).** Phytochemical profile and antioxidant activity of Algerian *Pinus halepensis* Mill. resin extracts. *Natural Product Research*, 29(5), p: 1–6.
 - **Bouguedoura N., Benaissa O. and Djamai, R. (2019).** Screening phytochemical components of Algerian *Pinus halepensis* resin. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 16(3), p: 1–7.
 - **Bouguerra F. (2022).** Étude phytochimique des extraits résineux de conifères nord-africains. *Revue Marocaine de Biologie*.
 - **Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. (2014).** Essential oils (from medicinal plants) as efficient antibacterials: updating recent findings and mechanisms. *BioMed Research International*, 2014, Article ID 651593. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>
 - **Boulâacheb N. (2010).** La résine de *pinus halepensis* Mill. Usage traditionnel par la Population de la petite kabylie (algerie, nord afrique). *Acta Horticulturae. International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*.853, p: 435-438.
 - **Boutchiche F. et Boutrigue S. (2016).** Caractérisation morphométrique de la chenille processionnaire (*Thaumetopoea pityocampa*) et de son hôte au niveau de la wilaya de Tlemcen. Mémoire master en génétique. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, p :12-15.
 - **Bouzenna H., Krichen F., Hakim A. and Abderrabba M. (2017).**Chemical composition and antioxidant activity of *Pinus halepensis* Mill. *Resin.Journal of Medicinal Plants Research*, 11(3), p : 53-58. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6296>
 - **Brochiero F., Chandieux O., Ripert C. and Vennetier M. (1999).** Autécologie et croissance du pin d'Alep en Provence calcaire. *Forêt méditerranéenne*, 20(2), p : 83-94.
 - **Buronzo, A. (2008).** Grand guide des huiles essentielles. *Hachette Pratique*.
characterization by gas chromatography-mass spectrometry: Raw and archaeological materials. *Journal of Chromatography* ,85, p: 164-173.

C

- **Chems A. E., Berrehal D. and Yahia A. (2017).** Étude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de la résine de *Pinus halepensis*. *Phytothérapie*, 15(3),p: 159-166.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Clinical overview of

aspergillosis : transmission essentiellement par inhalation de spores aérosolisées. CDC.

24 avril 2024.

- **CHAIEB, I. (2011).** Antibacterial activity of essential oils from *Pinus halepensis* against Gram-negative bacteria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2011, 14(5): 560–567.
- **BOUKHEZRA, A. (2020).** Activité antibactérienne de la résine de *Pinus halepensis*. Mémoire de Master, Université de Tizi-Ouzou.
- **Chermat S. and Gharzouli R. (2015).** Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria – An empirical knowledge in Djebel Zdim (Sétif). *Journal of Materials Science and Engineering*, 5(1–2), p: 50–59.
<https://doi.org/10.17265/2161-6213/2015.1-2.007>
- **Cheynier V., Comte G., Davies K. M., Lattanzio V. and Martens, S. (2013).** Plant phenolics : Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, p:1–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- **Ching P.L., Jen P.H., Chung-S W., Chih Y.H. and Chaw S.M. (2010).**
Chonoko UG. and Rufai AB. (2011). Phytochemical screening and antibacterial activity of Cucurbitapepo against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* 2011, 4, p: 145-147.
- **Ciulci. (1994).** Methodology for the analysis of vegetable drugs. Chemical industries branch, division of industrial operations. UNIDO Romania, 24, p : 26 -67 Comparative Chloroplast Genomics reveals the evolution of *Pinaceae* Genera and Subfamilies. *Genome Biology*, 2, p: 504–517.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (32nd ed.). CLSI supplement M100.
- **CLSI. (2008).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard—Second edition (M38-A2). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- **Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.01.020>

D

- **Dai J. and Mumper R. J. (2010).** Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), p : 7313-7352.
<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

- **Daoudi A., Bammou M., Haloui Z., Ibijbjen J. and Nassiri L. (2017).** Activité Antifongique des extraits aqueux de *calendula officinalis* L, Urginea Maritima (L.) Baker Et *Chenopodium Ambrosioides* L. *European Scientific Journal*, 13(24), p: 483-497.
- **Dai J. and Mumper R. J. (2010).** Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), p : 7313-7352.
<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- **Delmond, B. (2002).** Résines naturelles. *Techniques de l'Ingénieur*, 33, p 1–14.
- **Derouche H. (2015).** Télédétection et analyse des dépérissements des forêts Naturelles en zone semi-aride (Djelfa). Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach-Alger, p :198.
- **Djebbari Z., Belhattab R. and Zitouni H. (2020).** Valorisation de la résine du pin d'Alep : étude phytochimique et activité antioxydante des extraits. *Revue des Sciences et Technologies*, 58, p : 45–52.
- **Djebli, N., Ait-Yahia, D., & Aberkane, M. C. (2016).** Phytochemical screening and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Mill. resin. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(12), 926–929.
- **D-J. Cram et G.-S. Hammond.** Chimie organique, trad. par P. L'Écuyer. Paris. Gauthier-Villars, 1963, p : 568.
- **Djellouli N., Benmohamed M. and Zermane A. (2020).** Phytochemical screening and antioxidant potential of *Pinus halepensis* extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 14(2), p :80–87.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. and Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), p: 654–660.
- **Dominique Guillaume et Charrouf, Z. (2005).** Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*), *Cahiers Agricultures*, 14(6).
- **Donatien k. (2009).** Enquête ethnobotani que de six plantes médicinales maliennes - extraction, identification d'alcaloïdes -caractérisation, quantification de polyphénols : etude de leur activité antioxydante. Thèse de doctorat. France. Chimie organique. Université de bamako.
- **Dutertre J. (2011).** Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Thèse doctorat d'état, Université Bordeaux 2-Victor Segalen U.F.R des sciences médicales. France. p :33.

- **Entrouissi N. (2019)** – Évaluation de l'activité anti-radicalaire et quantification des composés phénoliques de *Pinus halepensis* (Mill.). Thèse de Magister en Biotechnologie Végétale, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi, Bordj Bou Arreridj, Algérie.
- **Espinosa E., Domínguez-Robles J., Savy D., Reverchon E. and Labidi, J. (2020).** Isolation and characterization of valuable compounds from Aleppo pine (*Pinus halepensis*) bark. *Industrial Crops and Products*, 146, p: 112-146.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112146>
- **European Medicines Agency (EMA). (2016).** Guideline on quality of herbal medicinal products. <https://www.ema.europa.eu>

F

- **Fancès M. (2019).** Etude de la mise au point d'un vernis industriel à base de colophane et d'huile végétale. Thèse doctorat : Polymères. Université de Pau et des Pays de l'Adour, p : 21- 25.
- **Farjon A. (2010).** A Handbook of the World's Conifers. *Brill Academic Publishers*. ISBN, (1).
- **Fekih N. (2015).** Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie. Thèse Tlemcen. Université Abou BekrBelkaid.
- **Firdouse S. and Alam P. (2011).** Phytochemical investigation of extract of *Amorphophallus campanulatus* tubers. *International Journal of Phytomedicine*, 3, p: 32-35.
- **Flieger J., Flieger W., Baj J. and Maciejewski R. (2021).** Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14(15), p: 4135.

G

- **Gellatly S. L. and Hancock R. E. (2013).** *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), p: 159-173.
<https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.
- **Ghanmi M., Satrani B., Chaouch A., Aafi A., Abid A.E., Ismaili M.R. et Farah A. (2007).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 154, p :293–300. <https://doi.org/10.1080/12538078.2007.10516058>.
- **Goubi M., Bentouati A., Kherchouche D. and Sghaier T. (2019).** Tarifs et tables de cubage d'arbres individuels du pin d'Alep, *Pinus halepensis* Mill., dans l'Aurès algérien. *BOIS and FORETS DES TROPIQUES*, 339, p : 45-59.

- **Grossenbacher E. (2011).** Pinède de pin d'Alep. *Groupe d'étude floristique du jura et du jura bernois*.
- **Guit B. (2015).** Croissance et état sanitaire des peuplements de pin d'alep (*pinus halepensis* Mill.) dans le massif forestier de Senalba (Région de Djelfa). Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie El-harache Alger, p :108.

H

- **Haffane M. (1982).** Contribution à l'étude du comportement de *Pinus Halepensis* dans les reboisements de Zoumi Mokrisat.
- **Haichour R, Lograda T, Ramdani M, Chalard P, Figueredo G.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Pinus halepensis* from Algeria. *Biodiversitas*. 2020;21:4345–60.
- **Haïoun et Hamoud. (2015).** Activité antioxydant de la plante médicinale Algérienne *Anethum graveolens* et leur effet cardioprotectrice contre la toxicité de la doxorubicine, 19, p :58.
- **Hajoori M., Naik M., Naik K. and Desai Bhagwan S. (2014).** Evaluation of antimicrobial activity of *Punica granatum* peel extracts using different solvent system. *International journal of Pharmacological Screening Methods*, 4(1), p: 26-31.
- **Halla, F., Haddouchi, T., & Chaouche, N. (2016).** Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 10.1007/s10298-016-1086-8.
- **Hammoudi, R., Benslama, A., & Gherib, A. (2020).** Phytochemical screening and antioxidant activity of hydro-ethanolic extract of *Pinus halepensis* resin. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(6-s), 149-153. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i6-s.4443>
- **Hamoussa H-S., Khaldi A. et Lekhal M. (2022).** Le recours à la phyto-aromathérapie dans les maladies liées au stress dans les wilayas de Tizi-Ouzou et de Boumerdes .Thèse d'état de doctorat en pharmacie Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri, Faculté de médecine, p 8-9.
- **Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G. and Rakesh D. D. (2008).** Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology.
- **Harborne J. B. (1998).** *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis* (3rd ed.). Springer.
- **Haslam E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59(2),p: 205-215. <https://doi.org/10.1021/np960040>.

- **Hauser A. R. (2009).** The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), p: 654-665.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>
- **Hellal Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Magister TIZI-OUZOU : Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Université mouloud Mammeri.
- **Holiste. (2017).** Biogemme is innovating the way pine resin is collected. Holiste Laboratoire et Développement.
- **Hossain MA, Al-Raqmi KAS, Al-Mijizy ZH, Weli AM, Al-Riyami Q. (2013).** Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* ,3, p:705-710.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112146>
<https://doi.org/10.1080/01811789.1988.10826883>.
<https://www.britannica.com/editor/Adam-Augustyn>

J

- **Jacques Macheix G. et Fleuriet A Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires. *Presses polytechnique et universitaire romandes*, p : 67-121.
- **Jin Y., Lee J. and Park J. (2022).** Biological roles and therapeutic potential of plant-derived steroids: A review. *Phytochemistry Reviews*, 21(4), p: 775–792.
<https://doi.org/10.1007/s11101-022-09780-z>
- **Joye N. M. and Lawrence R.V. (1967).** Resin Acid Composition of Pine Oleoresins. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 12, p: 279–281.

K

- **Kadik B. (1987).** Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie. Ecologie, dendrométrie, morphologie. Ed. OPU. Alger. p : 581.
- **Kadik B. (1987).** Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie. Ecologie, dendrométrie, morphologie. Office des publications universitaires (Alger). p : 585.
- **Kadri N. (2014).** Graines de *pinus sp.* Cartirisation physico-chimique et activité anticancéreuse. Université Abderrahmane Mira-Bejaia, p :170.

- **Kaper J. B., Nataro J. P. and Mobley H. L. T. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), p: 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- **Khadoumi A., Nedjimi B. et Daoudi B. (2014).** Sensibilité à la Chenille Processionnaire (*Thaumetopoea Pityocampa Schiff.*) chez deux espèces de Pins (*Pinus Halepensis Mill.* et *Pinus Brutia Ten.*) : Cas du Reboisement de Senelba Chergui (Djelfa). *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 4, p : 20-25.
- **Kheyar-Kraouche N., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. and Aouiche A. (2020).** Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Pinus halepensis* resin. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 8(5), p: 390–399.
- **Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en ouganda activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat. Ouganda. Écologie et chimie des substances naturelles : muséum national d'histoire naturelle.
- **Kyoung S. C., Young-ran L., Kyungho L., Jaeseok L., Jang H. L. and ImSoon, L. (2017).** Terpenes from Forests and Human Health. *Toxicological Research*, 33(2), p: 97-106. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.2.097>.

L

- **Lakreb N., Sen U., Bezzazi B. and Pereira H. (2022).** The physicommechanical and thermal properties of Algerian Aleppo pine (*Pinus halepensis*) wood as a component of sandwich panels. *iForest – Biogeosciences and Forestry*, 15(2), p: 106-111. <https://doi.org/10.3832/ifor3952-015>.
- **Langenheim J. H. (2003).** *Plant resins: ecology, evolution, and ethnobotany*. Timber Press.
- **Langenheim J.H. (2003).** Plant Resins – Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany. Edition , p: 24.
- **Larousse. (2020).** Montage à reflux en chimie [Illustration]. In Larousse.fr - Encyclopédie. <https://www.larousse.fr>
- **Lateef, D. A., Ahmed, M. H., & Hameed, S. A. (2023).** A review on biological activities of coumarin derivatives. *World Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 2(6), p: 158–170.

https://www.researchgate.net/publication/379695966_A_REVIEW_ON_BIOLOGICAL_ACTIVITIES_OF_COUMARIN_DERIVATIVE

- **logan CG, Rodríguez-Díaz M.** *Bacillus* spp. and foodborne illness. *J Appl Microbiol.* 2012.
- **López, V. (2011).** Are traditional medicinal plants and ethnobotany still valuable approaches in pharmaceutical research? *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(1),p : 3–10.
- **Lowy F. D. (1998).** *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), p : 520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>.

M

- **Madigan M. T., Bender K. S., Buckley D. H., Sattley W. M. and Stahl D. A. (2018).** Brock Biology of Microorganisms (15th ed.). Pearson.
- **Maggi F. (2020).** Chemical composition of essential oils and resins from Mediterranean *Pinus* spp. *Industrial Crops and Products*, 145, p : 111-990.
- **Makkar HPS. (2003).** Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. Dordrecht, Germany: Kluwer Academic Publishers.
- **Malik R. N., Siddique M. A. A., Sofi P. A. and Butola J. S. (2011).** Ethnomedicinal practices and conservation status of medicinal plants of North Kashmir Himalayas. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(5), p: 515–530. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2011.515.530>.
- **Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez, L. (2004).** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5),p: 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- **MANSOUR S. (2015).** Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium* L, *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scarboides*- Etude *in vivo*. Thèse de Doctorat, Univ. Mohamed BOUDIAF.Oran. p :19.
- **Marc F., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. and Fritsch P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 20(4), p : 458-463.
- **Marijon A., Buffaz C., Hodille E., Jourdy. et Louvrier C.(2020).** Parasitologie et mycologie médicale. (2 éme édition). De boeck supérieure. Paris.
- **Marref S. E. (2018).** Contribution à l'étude des activités biologiques de l'extrait méthanolique de la plante *Gladiolus segetum* *in vivo* et *in vitro*. Thèse de doctorat troisième cycle. Batna : Biologie des organismes. Université Mustafa ben boulaïd.

- **Meddour A. and Meddour-Sahar A. (2015).** L'utilisation traditionnelle de la résine de pin en Algérie.
- **Modugno F., Ribechini E. and Colombini M.P. (2006).** Aromatic resin
- **Mohamed H. Y. (2006).** Étude sur la résine de Pin d'Alep et ses réponses aux agressions.
- **Mukherjee P. K. (2009).** *Evidence-based validation of herbal medicine* [et autres contributions]. Elsevier.
- **Muzzamal H., Sarwar R., Sajid I. and Hasnain S. , (2012).** Isolation, identification and screening of endophytic bacteria antagonistic to biofilm formers. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(1).

N

- **Nagaraju kancherla., anusha dhakshinamoothi., K CHIRA., Ravi babu. and Komaram. (2019).** Preliminary analysis of phytoconstituents and evaluation of anthelmintic property of *Cayratia auricula* (*in vitro*). *Déc*, 14 (4), p :350-356.
- **Nahal I. (1962).** Le Pin d'Alep. Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. *Annales de l'école nationale des eaux et forêts*, 19(4), p : 533- 627.
- **Nikaido, H. (1996).** Outer membrane as a diffusion barrier. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60(1), 1–32.
- **Nikaido, H. (2003).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
- **Nucci M. and Anaissie E. (2022).** *Fusariosis* in immunocompromised hosts: Clinical features and treatment strategies. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(9), p : 1261-1273. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00167-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00167-8)

O

- **Okuda T., Yoshida T. and Hatano T. (2005).** Chemistry and biological activities of hydrolyzable tannins. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, p: 519–594.
- **Organisation mondiale de la Santé. (2003).** *WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems*.
- **Otto M. (2014).** *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*, 17, p: 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>

P

- **Panche A. N., Diwan A. D. and Chandra S. R. (2016).** Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, p: 47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- **Pardé J. (1957).** La productivité des forêts de Pin d'Alep en France. *Annales de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts et de la Station de Recherches et Expériences*

Forestières, 15(2), p : 365-415.

- **Parekh J. and Chanda S. (2007).** *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 31, p : 53–58.
- **Pauline R. (2019).** De la biosynthèse des flavanols aux tanins du vin : quelle place pour les pépins de raisin ? thèse de doctorat : Œnologie. École doctorale sciences de la vie et de la santé.
- **Pel H. J., de Winde J. H., Archer D. B., Dyer P. S., Hofmann G., Schaap P. J. and Stam H. (2007).** Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2),p : 221-231.
<https://doi.org/10.1038/nbt1282>
- **Pichersky E. and Lewinsohn E. (2011).** Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 62,p: 549-566.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103814>
- **Pietta P. G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), p: 1035-1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>

Q

- **Qnais E.Y., Elokda A.S., Abu Ghalyun Y.Y., Abdulla F.A .(2007).** Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of *Punica granatum* (Pomegranate) Peels. *Pharmaceutical Biology*, 45(9), p: 715-720.
- **Quézel P. (2000).** Réflexions sur l'évolution de la flore et de la végétation au Maghreb méditerranéen. Paris : Ibis Press,1, p : 1-10.
- **Quézel P. and Barbéro M. (1992).** Le pin d'Alep et les espèces voisines : répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. *Forêt méditerranéenne XIII*, (3), p : 158-170.

R

- **RIGANE, G., BEN CHEIKH, W. (2019).** Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oils from Tunisia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, 2(10): 798–805. HASSANI, F., et al. Étude de l'activité antibactérienne de la résine du pin d'Alep. Mémoire de Master, Université de Bejaia.
- **Rahila C., Azzi, i. E. and Tires A. T. (2022).** Étude de l'effet antibactérienne et antioxydant de deux plantes médicinales (*satureja candidissima* et *nepeta nepettela*). Mémoire de mastrer. Microbiologie Appliqué, Ain Temouchent: Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaïb.
- **Rashid S., Ahmad M., Zafar M., Sultana S., Ayub M., Khan M. A. and Yaseen G. (2015).** Ethnobotanical survey of medicinally important shrubs and trees of Himalayan

- region of Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 166, p:340–351. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.042>
- **Rathgeber S., Monkenbusch M., Kreitschmann M., Urban V. and Brulet A. (2002).** Dynamics of star-burst dendrimers in solution in relation to their structural properties. *The Journal of chemical physics*, 117(8), p : 4047-4062.
 - **Rebbas K., Bounar R., Gharzouli R., Ramdani M., Djellouli Y. and Alatou D. (2012).** Plantes d'intérêt médicinal et écologique dans la région d'Ouanougha (M'sila, Algérie). *Phytothérapie*, 10(2), p: 131–142.
 - **Reguieg, L. (2011).** *Étude ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques en Algérie*. Université ou éditeur.
 - **Rezzi S., Bighelli A., Castola V. and Casanova J. (2005).** Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra ssp. laricio* from Corsica. *Industrial Crops and Products*, 21, p:71. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.12.008>
 - **Richter G. (1993).** Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie.
 - **Rodrigues K.C.S. and Fett-Neto A.G. (2009).** Oleoresin yield of *Pinus elliottii* in a subtropical climate: Seasonal variation and effect of auxin and salicylic acid-based stimulant paste. *Industrial Crops and Products*, 30, p: 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.06.004>
 - **Rodrigues-Corrêa D and Neis O. M. (2019).** Multiple industrial uses of non-wood pine products. *International Journal of Molecular Sciences*.
 - **Rodríguez-García A., López R., Martín J.A., Pinillos F. and Gil L. (2014).** Resin yield in *Pinus pinaster* is related to tree dendrometry, stand density and tapping-induced systemic changes in xylem anatomy. *Forest Ecology and Management*, 313, p: 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.10.038>.
 - **Roman P., Martyna K.S., Mariusz T. and Jan F. (2007).** Terpenes: substances useful in human healthcare, 55, p: 315–327.
 - **Rosselló-Móra R. and Amann R. (2015).** Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), p: 209-216. <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-bacterie-101>.
 - **Ryan K. J. and Ray C. G. (2022).** *Sherris Medical Microbiology* (8th ed.). McGraw-Hill Education.

S

- **Sangeetha R. and Jayaprakash A. (2015).** Phytochemical Screening of *Punica granatum* Linn. Peel Extracts. *Journal of Academic and Industrial Research*, 4, p:160-162.
- **Sanogo R. (2006).** *Le Rôle des Plantes Médicinales en Médecine Traditionnelle*.

Développement, Environnement et Santé. 10ème école d'été de l'IEPF et SIFEE du 06 au 10 juin 2006, p : 53.

- **Sarker S. D., Latif Z. and Gray A. I. (2006).** Natural products isolation (2nd ed.). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-955->
- **Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K. M. and Latha L. Y. (2011).** Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), p: 1–10. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>
- **Satil F., Selvi S. and Polat R. (2011).** Ethnic uses of pine resin production from *Pinus brutia* by native people on the Kazdag Mountain (Mt. Ida) in Western Turkey. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9(3–4), p:1059–1063.
- **Serge Gouegoui Bohui P., Amissa Adima A., Bobelé Niamké F. and David J. N. (2018).** Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim, January*.
- **Shuaib M., Ali M., Ahamad J., Naquvi K. J. and Ahmad M. I. (2013).** Pharmacognosy of *Pinus roxburghii* : A Review. *Phytochemistry*, 2(1), p: 262–268. <https://www.researchgate.net/publication/250615628>
- **Sogoba I., Kaboré H., Sawadogo A. and Somda, I. (2023).** Pathogenicity of *Fusarium spp.* isolated from onion in Burkina Faso. *American Journal of Plant Sciences*, 14(5), p: 1096-1106. <https://doi.org/10.4236/ajps.2023.145065>

T

- **Taiz L., Zeiger E., Møller I. M. and Murphy A. (2015).** Plant Physiology and Development (6th ed.). Sinauer Associates.
- **Todar K. (2012).** Todar's Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin. <https://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- **Tortora G. J., Funke B. R. and Case C. L. (2020).** Microbiology: An Introduction (13th ed). Pearson.
- **Toudert-Taleb K., Hedjal-Chebheb M., Hami H., Kellouche A. and Debras JF (2014).** Composition des huiles essentielles extraites de six plantes aromatiques d'origine kabyle (Algérie) et évaluation de leur bioactivité sur *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (ColeopteraBruchidae). *Entomologie africaine* , 22 (2), p: 417-427.

- **Tümen I. and Reunanen M. (2010).** A comparative study on turpentine oils of oleoresins of *Pinus sylvestris* L. from three districts of Denizli. *Records of Natural Products*, 4(4), p: 224–229.

W

- **Wang Y., Zhang L. and Chen H. (2023).** Pathogenic mechanisms of *Fusarium* species on crops. *Agriculture*, 13(9), p: 1810.
<https://doi.org/10.3390/agriculture13091810>
- **Wink M. (2003).** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), p: 3-19.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- **World Health Organization. (2023).** Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) report 2023. <https://www.who.int>.

Z

- **Zahoor M., Shabbir A., Akhter N. and Mahmood A. (2023).** Recent advances in steroidal compounds and their biological applications: A review. *Steroids*, 198, p: 109093. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109093>
- **Zengin, G., Mahomoodally, M. F., Aktumsek, A., & Cziáky, Z. (2018).** Chemical composition and biological properties of resin from *Pinus* species. *Industrial Crops and Products*, 121, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.053>
- **Zermane H. (2022).** Comparaison des extraits méthanoliques et chloroformiques chez le Pin d'Alep. *Journal des Sciences de la Nature*.
- **Zhang J., Gao W. and Wang, Z. (2022).** Structural Diversity, Bioactivities, and Biosynthesis of Alkaloids from Plants. *Natural Products and Bioprospecting*, 12(1), p : 1–24. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00366-9>
- **Zhang N., Bai G., Ma L. and Liu Y. (2023).** Genome-based taxonomic revision of the *Fusarium oxysporum* species complex. *Phytopathology Research*, 5, p: 12.
<https://doi.org/10.1186/s42483-024-00274-5>

Annexes

Annexe 01 : Réactifs utilisés**Réactif de MAYER**

Chlorure de mercure 1,36 g

Iodure de potassium..... 5 g

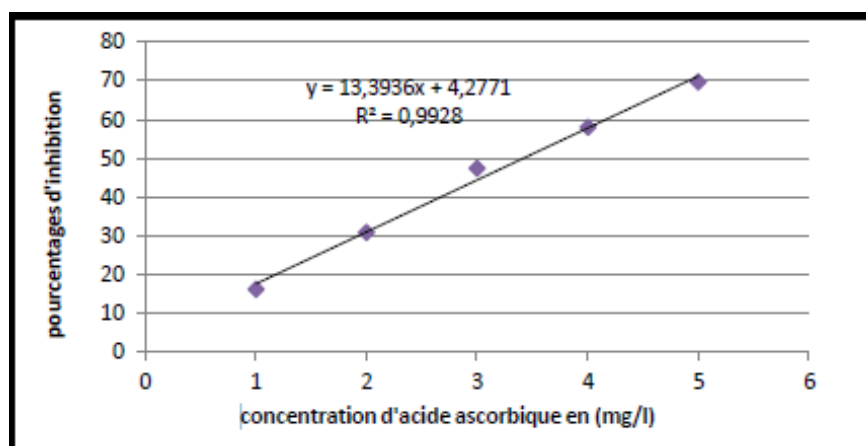
Eau distilléeqsp 100 ml

Réactif de WAGNER

Iodure de potassium..... 2 g

Iode 1,27 g

Eau distillée qsp 100 ml

Annexe02 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique**Annexe03 : Milieu de culture****Milieu Sabouraud (SAB)**

Poudre déshydratée de Sabouraud... 65g

Eau distillée 1L

Peser 65 g de poudre déshydratée de Sabouraud dans un 1 litre de l'eau distillée dans un erlenmeyer et bien agiter et chauffer sur un agitateur magnétique, vérifier le Ph (**5,6 ± 0,2 à 25 °C**). **Après le stériliser dans l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.**

Abstract

Aleppo pine resin, belonging to the Pinaceae family, is found throughout the bioclimatic zones of northern Algeria, from the coast to the Saharan Atlas. It is a medicinal plant renowned for its therapeutic properties and wide range of applications.

Our work aims to better define this plant and its richness in active compounds in order to evaluate its biological activities and validate their potential in the medical field. Three solvents (methanol, hydroethanol, and chloroform) were used to compare their ability to extract secondary metabolites from the resin, with a view to optimizing the yield of bioactive compounds and evaluating their biological activity.

The yields obtained for the extracts were: 88.6% for the methanolic extract, 79.4% for the hydroethanolic extract, and 86.1% for the chloroform extract. Phytochemical screening of the three extracts revealed a richness in bioactive compounds. The hydro-ethanolic and chloroformic extracts have the highest polyphenols and flavonoids contents. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH radical scavenging test, highlighting a significant efficacy for the hydro-ethanolic extract with an IC₅₀ of 10.08 (µg/ml), followed by the chloroformic extract by 13.62 (µg/ml). The antimicrobial activity of the three extracts was evaluated using the well method, against four bacterial strains and three fungal strains. The results showed inhibitory activity of all extracts against *Staphylococcus aureus*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 5 mg/ml. All other species tested, whether bacterial (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*) or fungal (*Candida albicans*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*), proved resistant to the extracts.

Keywords: Aleppo pine, resin, methanolic extract, hydroethanolic extract, chloroformic extract, Phytochemical Study, Biological Activities

المخلص

صمغ الصنوبر الحلبي، الذي ينتمي إلى الفصيلة الصنوبرية، ينتشر في جميع أنحاء المناطق المناخية الحيوية بشمال الجزائر، من الساحل إلى أطلس الصحراء. وهو نبات طبي معروف بخصائصه العلاجية وتطبيقاته الواسعة يهدف عملنا إلى تعريف هذا النبات وراثته بالمركبات النشطة بشكل أفضل، بهدف تقييم أنشطته البيولوجية والتحقق من إمكاناته في المجال

الطبي. استُخدمت ثلاثة مزييات (الميثانول، والهيدروإيثانول، والكلوروفورم) لمقارنة قدرتها على استخلاص الأنشطة البيولوجية الثانوية من الصمغ، بهدف تحسين إنتاج المركبات النشطة بيولوجيًا وتقييم نشاطها البيولوجي كانت نسب إنتاج المستخلصات: 88.6% للمستخلص الميثانولي، و79.4% للمستخلص الهيدروإيثانولي، و86.1% للمستخلص الكلوروفورم. كشف الفحص الكيميائي النباتي للمستخلصات الثلاثة عن ثراء في المركبات النشطة بيولوجيًا. تحتوي المستخلصات الهيدروإيثانولية والكلوروفورمية على أعلى محتوى من البوليفينول والفلافونويد. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبار إزالة الجذور الحرة DPPH، مما أبرز فعالية كبيرة للمستخلص الهيدروإيثانولي مع IC50 بقيمة 10.08 (ميكروغرام/مل)، يليه المستخلص الكلوروفورمي بقيمة 13.62 (ميكروغرام/مل). تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات الثلاثة باستخدام طريقة البئر، ضد أربع سلالات بكتيرية وثلاث سلالات فطرية. أظهرت النتائج نشاطًا مثبطًا لجميع المستخلصات ضد المكورات العنقودية الذهبية، مع تركيز مثبط أدنى المختبرة، (CMI) قدره 5 ملغ/مل. أثبتت جميع الأنواع الأخرى سواء كانت بكتيرية

Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis

أو فطرية مقاومتها للمستخلصات

Candida albicans, Fusarium sp., Aspergillus niger

الكلمات المفتاحية: الصنوبر الحلبي، الصمغ، المستخلص الميثانولي، المستخلص الإيثانولي المائي، المستخلص الكلوروفورمي، الدراسة الفيتوكيميائية، الأنشطة البيولوجية

Année universitaire : 2025-2024	Présenté par : SAKHRI Riham BOUHELLASSA Sara
Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique des extraits de résine de Pin d'Alep	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master professionnel en Microbiologie et hygiène hospitalière.	
<p>La résine de Pin d'Alep, appartenant à la famille des Pinacées, est présente sur l'ensemble des étages bioclimatiques du nord de l'Algérie, depuis le littoral jusqu'à l'Atlas saharien. Il s'agit d'une plante médicinale reconnue pour ses propriétés thérapeutiques et son large spectre d'applications.</p> <p>Notre travail a pour objectif de mieux définir cette plante et sa richesse en composés actifs afin d'évaluer ses activités biologiques et d'approuver leur potentiel dans le domaine médical. Trois solvants (méthanol, hydro-éthanol et chloroforme) ont été utilisés pour comparer leur capacité à extraire les métabolites secondaires de la résine, en vue d'optimiser le rendement en composés bioactifs et d'évaluer leur activité biologique.</p> <p>Les rendements obtenus pour les extraits sont : 88,6 % pour l'extrait méthanolique, 79,4 % pour l'extrait hydroéthanolique et 86,1 % pour l'extrait chloroformique. Le screening phytochimique des trois extraits révèle une richesse en composés bioactifs. Les extraits hydro-éthanolique et chloroformique présentent les plus grandes teneurs en polyphénols et en flavonoïdes. L'activité anti-oxydante a été évaluée à l'aide du test de piégeage du radical DPPH, mettant en évidence une efficacité significative pour l'extrait hydro-éthanolique avec une IC₅₀ de 10,08 (µg/ml), suivi de l'extrait chloroformique par 13,62 (µg/ml). L'activité antimicrobienne des trois extraits a été évaluée à l'aide de la méthode des puits, vis-à-vis de quatre souches bactériennes et trois souches fongiques. Les résultats ont montré une activité inhibitrice de l'ensemble des extraits contre <i>Staphylococcus aureus</i>, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 5 mg/ml.</p> <p>Toutes les autres espèces testées, qu'elles soient bactériennes (<i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Bacillus subtilis</i>) ou fongiques (<i>Candida albicans</i>, <i>Fusarium sp.</i>, <i>Aspergillus niger</i>), se sont révélées résistantes aux extraits.</p>	
Mots-clés : Pin d'Alep, résine, extrait méthanolique, extrait hydro-éthanolique, extrait chloroformique, Etude phytochimique, activités biologiques	
Laboratoires de recherche : Laboratoire de de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), FSNV-(U Constantine 1 Frères Mentouri).	
Président du jury : Dr ZITOUNI Hind (MCB – Université Constantine 1 Frères Mentouri). Encadrant : Dr BATAICHE Insaf (MCA - Université Constantine 1 Frères Mentouri). Examineur(s) : Dr MILET Asma (MCB - Université Constantine 1 Frères Mentouri).	