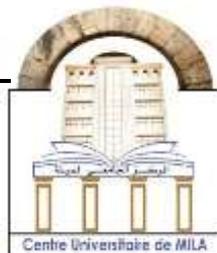


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N° Réf : .....

**Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf- Mila**

**Institut des Sciences et de la Technologie**

**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de**

**Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biochimie Appliquée**

**Thème :**

**Etude phytochimique et biologique de la résine de pin**

**Présenté par :**

- **HOUADEC Chahinaz**
- **LEGRIQUI Djouheina**
- **DAAS Soumia**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	<b>Dr. BENRABAH Hicham MCA</b>	<b>Centre universitaire Mila</b>
<b>Examinatrice :</b>	<b>Dr. BAATOUCHE Samia MCB</b>	<b>Centre universitaire Mila</b>
<b>Promotrice :</b>	<b>Dr. AMIMOUR Mouna MCB</b>	<b>Centre universitaire Mila</b>

**Année Universitaire : 2022/2023**

## **Remerciement**

*Avant toute chose, nous remercions **ALLAH**, Le tout puissant, pour Nous avoir orienté vers le droit chemin, pour nous avoir aidé tout au long de nos années d'étude, ainsi pour nous avoir donné la force, la volonté et la patience dans l'accomplissement de ce travail.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice **Mme Amimour Mouna**, qui nous a dirigées avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire et surtout pour sa bonne humeur, ainsi pour le temps qu'elle nous a consacré et sans elle ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury **Dr. Samia Baatouche** et **Dr. Badis Khennaoui** qui vont juger notre recherche*

*Un énorme merci tous les travailleurs de laboratoire d'analyse médicale de **Dr.Mirouh** précisément **Dr .Mirouh** qui faite un gros effort avec nous et le responsable de la paillasse de microbiologie **Imane** merci infiniment.*

*Merci également au **melle Houda** et **Dr Ali.Debbi** directeur de laboratoire de mycologie au centre de Recherche en Biotechnologie constantine (CRBt).*

*Et enfin, nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance envers toutes les personnes qui ont participé à ce travail de près ou de loin, qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleures des conditions.*

**Chahinaz, Djouheina, Soumia**

## **Dédicace**

*Du profond de **mon cœur***

*Je dédie se travail à tous ceux qui me sont chère,*

**Mes très chers parents**

*Aucun dédicace ne saurait exprimer mon respect et ma gratitude, je vous remercie pour tout le soutien, l'encouragement et l'amour que vous me portez depuis mon enfance, Puisse Dieu, vous accorder santé, bonheur et longue vie. "*

*A qui leurs rires remplissent ma vie de joie et de bonheur, mes sœurs : **Hakima, Hanane, Zienb** et la meilleur **Achwak** du monde « je t'aime»*

*Au meilleur deux frères : **Nour Eldin** et **Abd Elghani** pour leur encouragements.*

*A les chers enfants de notre maison : **Israa, Abd elnour, Chmissou, Tawba,Âmina,Milina** et le petite cher **Saned**.*

*A mon très cher fiancé **Heythem** qui m'a soutenu et encourager sans cesse pour terminer ce travail.*

*A mes chers amis de l'université :**Racha,Hawa ,Soumia,Roumaissa**, et la jolie **Djouheina** qui partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et ces années universitaire et qui m'a été d'un grand soutien.*

*A ma chère amie d'enfance la belle **Belkiss**.*

*A tous les membres de ma famille.*

*Je dédie aussi mon travail à mes beaux **chats**.*

*Je voudrais adresser mes remerciements à tous ceux que j'ai oublié de nommer et a tous ceux qui me connue.*

**Chahinaz ♥**

## ***Dédicace***

*A ma très chère mère **DALILA***

*Qui été toujours à mes côtés durant toutes les années des études, celle qui s'est toujours sacrifiée pour me voir réussir merci pour vous patience, J'espère que tu es fier de ma réussite. je t'aime maman*

*A mon très cher père **ALI***

*A l'homme, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect Votre souci a toujours été le bonheur et la satisfaction de vos filles, vous avez été mon soutien et ma force tout au long de mes études. je t'aime papa*

*A mes très chères Sœurs **AMANI ,MANEL,NIHAD***

*Vous êtes ma vie et ma force dans cette vie. Merci d'être toujours à mes côtés*

*A les maris de mes sœurs **KARIM et OUTHMENE***

*A mes amies **ROMAISSA, RACHA, HAWA, SOUMIA et ma chère binôme***

***CHAHINAZ***

*Pour votre sincère amitié et les bons moments que nous avons passés ensemble tout au long de nos études*

*A ma moitié **AMIRA** Qui a toujours été à mes côtés et m'a aidé et supporté dans les moments difficiles. Je vous aime ♥*

*A tout ma famille A tous mes autres ami(e)s. A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.*

***DJOUHEINA♥***

## ***Dédicace***

*Je dédie ce travail à ma mère **Souad** la lumière de ma vie qui m'a toujours comblée d'amour et tendresse, celle s'est toujours sacrifiée pour me voir réussir merci pour ton soutien sans égal.*

*A mon père **Mohmed** mon source de joie .tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux et honnête je voudrai remercier pour ton amour, ton Soutien dans tous mon parcours.*

*Dédié à ma chère sœur **Imene**, mon soutien dans la vie. Merci pour tout l'amour et les encouragements pour moi tout le temps.*

*A mes chère frères **Abderrahmen** et **Yahia** merci pour ton soutien et ton amour et encouragements dans ma vie.*

*A mes binômes **Chahinaz** et **Djouheina**. Surtout **Chahinaz** tu es ma sœur, nous avons passé les plus beaux jours avec toi.*

*A mes amis, et à tous mes familles.*

***Soumia♥***

### Résumé

A travers ce travail, une étude phytochimique et biologique a été évaluée de trois échantillons : extrait *n*-hexane de la résine (ER), macérât de la résine dans l'huile (RHO) d'olive et l'huile d'olive pure (HO).

Le criblage phytochimique de l'extrait *n*-hexane de la résine révèle la présence des coumarines et Quinones libre.

La teneur en polyphénols totaux de l'huile d'olive pure est d'environ 61.73mgEAG/kg. Cette teneur connue une augmentation significative pour le macérât huileux (431.925 mgEAG/kg), de même le macérât huileux possède un pouvoir antioxydant supérieur à (41.52 %) alors que celle de l'huile d'olive ne dépasse pas 3.45%.

L'activité antimicrobienne a été testée sur trois souches bactériennes pathogènes et deux souches fongiques pathogènes, les résultats montrent que seul l'extrait *n*-hexane de la résine possède un effet antibactérien vis-à-vis deux souches bactériennes, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition respectivement de 14 et 12mm. Tandis que le macérât huileux montre une inhibition totale envers la croissance de la souche *botrytis*.

Les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis les deux voies exogène et endogène réalisée in vitro montre que l'extrait *n*-hexane de la résine révèle effet coagulant. Alors que les deux huiles n'ont aucune activité.

**Mots clés :** résine de pin, macérât huileux, huile d'olive, composés phénoliques, métabolites secondaire, antioxydant, antibactérienne, antifongique, anticoagulante.

## **Abstract**

In this work, a phytochemical and biological study was carried out on three samples: resin n-hexane extract (ER), resin macerate in olive oil (RHO) and pure olive oil (HO).

Phytochemical screening of the n-hexane resin extract revealed the presence of coumarins and free quinones.

The total polyphenol content of pure olive oil is approximately 61.73mgEAG/kg. This content increased significantly for the oily macerate (431.925 mgEAG/kg), and the oily macerate also had a higher antioxidant power (41.52%) than the olive oil (3.45%).

Antimicrobial activity was tested on three pathogenic bacterial strains and two pathogenic fungal strains. The results showed that only the n-hexane extract of the resin had an antibacterial effect on two bacterial strains, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, with a zone of inhibition of 14 and 12 mm respectively. The oily macerate showed total inhibition of the growth of the botrytis strain.

The results of the in vitro anticoagulant activity against both exogenous and endogenous pathways showed that the n-hexane extract of the resin had a coagulant effect. The two oils had no activity.

**Key words:** pine resin, oily macerate, olive oil, phenolic compounds, secondary metabolites, antioxidant, antibacterial, antifungal, anticoagulant.

### ملخص

من خلال هذا العمل، تم تقييم دراسة كيميائية نباتية وبيولوجية على ثلاث عينات: مستخلص n-hexane لعلك الصنوبر (ER) ، ومنقوع علك الصنوبر في زيت الزيتون (RHO) وزيت الزيتون النقي. (HO).

يكشف الفحص الكيميائي النباتي لمستخلص n-hexane لعلك الصنوبر عن وجود الكومارين والكينون الحر.

يبلغ إجمالي محتوى البوليفينول في زيت الزيتون النقي حوالي 61.73 ملجم / كجم. عرف هذا المحتوى زيادة معتبرة في المنقوع الزيتي (431.925 ملجم EAG / كجم). بالمثل فإن المنقوع الزيتي له قوة مضادة للأكسدة أكبر من (41.52%) في حين أن زيت الزيتون لا يتجاوز 3.45%.

تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات على ثلاث سلالات بكتيرية ممرضة وسلالتين من الفطريات الممرضة ، وأظهرت النتائج أن مستخلص علك الصنوبر n-hexane فقط له تأثير مضاد للجراثيم ضد سلالتين من البكتيريا ، *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* مع منطقة تثبيط تبلغ 14 و 12 ملم على التوالي. بينما يُظهر النقع الزيتية تثبيطاً تاماً لنمو سلالة بوتريتييس.

تظهر نتائج النشاط المضاد للتخثر الذي طبق على المسارين الخارجي و الداخلي اللذين تم إجراؤهما في المختبر أن مستخلص n-hexane لعلك الصنوبر يكشف عن تأثير التخثر. بينما كلا الزيتين ليس لهما أي نشاط.

**الكلمات المفتاحية:** علك الصنوبر ، النقع الزيتية ، زيت الزيتون ، المركبات الفينولية ، المستقلبات الثانوية ، مضادات الأكسدة ، مضاد للجراثيم ، مضاد للفطريات ، مضاد للتخثر.

## Table des matières

*Remerciement*

*Dédicace*

Résumé

Abstract

ملخص

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

*Introduction* ..... 1

### Chapitre I : synthèse bibliographique

I.	Résine de pins .....	4
	I.1. Généralité sur les pins .....	4
	I.2. Description botanique .....	4
	I.3. Classification.....	4
	I.4. Répartition géographique.....	5
	I.5. Résine de pin .....	6
	I.5.1. Composition de la résine de pin .....	6
	I.5.2. Types de la résine de pin .....	7
	I.5.3. Synthèse et distribution de la résine dans l'arbre .....	7
	I.5.4. Récolte de la résine.....	7
	I.5.5. Utilisation thérapeutique de la résine de pin.....	8
II.	Huile d'olive .....	9
	II.1. Généralité sur l'olivier .....	9
	II.2. Classification botanique d'olivier .....	9
	II.3. Répartition géographique des oliviers .....	10
	II.3.1. Répartition dans le monde.....	10
	II.3.2. Répartition en Algérie .....	10

---

II.4. Olive.....	10
II.5. Huile d'olive .....	11
II.5.1. Composition chimique de l'huile d'olive.....	11
II.5.2. Intérêt nutritionnel et thérapeutique de l'huile d'olive.....	14
III. Métabolites secondaires .....	15
III.1. Généralités .....	15
III.2. Classification .....	15
III.2.1. Composés phénoliques.....	15
III.2.2. Les terpénoïdes .....	19
III.2.3. Les alcaloïdes.....	19
IV. Activités biologiques.....	20
Généralité.....	20
IV.1. Activité antioxydant .....	20
IV.1.1. Stress oxydant.....	20
IV.1.2. Radicaux libres .....	21
IV.1.3. Les antioxydants .....	21
IV.2. Activité antibactérienne.....	21
IV.2.1. Souches bactériennes étudiées.....	22
IV.3. Activité antifongique .....	23
IV.3.1. Les antifongiques.....	23
IV.3.2. Les champignons .....	23
IV.3.3. Les champignons phytopathogènes .....	23
IV.3.4. Champignons phytopathogènes utilisés.....	24
IV.4. Activité anticoagulante.....	26
IV.4.1. La coagulation .....	26
IV.4.2. Les tests de coagulation .....	27
IV.4.3. Les troubles de la coagulation .....	27

**Chapitre II : Matériel et méthode**

I. Matériel .....	29
I.1. Matériel végétal.....	29

---

II.	Méthode .....	29
II.1.	Préparation des extraits .....	30
II.1.1.	Extrait de la résine (ER) .....	30
II.1.2.	Extrait du macéra la résine dans l'huile d'olive(RHO) .....	30
II.2.	Calcul de rendement de ER.....	30
II.3.	Screening phytochimique.....	31
II.4.	Dosage des poly phénols totaux.....	32
II.4.1.	Réactifs utilisés.....	32
II.4.2.	Principe.....	32
II.5.	Evaluation des activités biologiques .....	34
II.5.1.	Activité antioxydants.....	34
II.5.2.	Activités antibactériennes.....	35
II.5.3.	Activité antifongique .....	38
II.5.4.	Activité anticoagulante.....	41

**Chapitre III : Résultats et discussion**

I.	Partie phytochimique .....	45
I.1.	Rendement d'extraction .....	45
I.2.	Screening phytochimique .....	45
I.3.	Dosages des polyphénols totaux.....	47
II.	Activités biologiques .....	48
II.1.	Evaluation de l'activité antioxydant .....	48
II.2.	Evaluation de l'activité antibactérienne .....	49
II.3.	Evaluation de l'activité antifongique .....	51
II.4.	Evaluation de l'activité anticoagulante .....	53
II.4.1.	Effet de l'extrait de la résine (ER) sur la voie coagulante exogène (TQ) et endogène (TCK).....	53
II.4.2.	Effet de RHO et HO sur la voie coagulante endogène (TCK) et exogène (TQ) .....	55
	<i>Conclusion</i> .....	59

Références bibliographiques

Annexes

**Liste des figures**

<b>Figure 1</b> : Le pin d'Alep .....	4
<b>Figure 2</b> : La répartition géographique de pin en Algérie .....	6
<b>Figure 3</b> : la résine de pin .....	6
<b>Figure 4</b> : Le gemmage traditionnel .....	8
<b>Figure 5</b> : Carte oléicole d'Algérie.....	10
<b>Figure 6</b> : Différentes parties de l'olive .....	10
<b>Figure 7</b> : structure de deux composés phénoliques de base; acide salicylique, acide caféique .	16
<b>Figure 8</b> : structures chimiques de tannins hydrolysables .....	18
<b>Figure 9</b> : Structures chimiques d'un tanin condensé .....	18
<b>Figure 10</b> : structure chimique de coumarines .....	19
<b>Figure 11</b> : structure des deux composés sesquiterpéniques. ....	19
<b>Figure 12</b> : structure chimique des alcaloïdes .....	20
<b>Figure 13</b> : <i>Botrytis cinerea</i> .....	24
<b>Figure 14</b> : <i>fusarium sp</i> .....	26
<b>Figure 15</b> : résine de pin poudre.....	29
<b>Figure 16</b> : huile d'olive .....	29
<b>Figure 17</b> : protocole de dosages des polyphénols .....	34
<b>Figure 18</b> : principe de l'activité antioxydant .....	35
<b>Figure 19</b> : l'ensemencement de l'inoculum .....	37
<b>Figure 20</b> : Formation de précipité.....	42
<b>Figure 21</b> : Teneurs des polyphénols totaux des extraits étudiés. ....	47
<b>Figure 22</b> : pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits testés. .....	49
<b>Figure 23</b> : histogramme de pourcentage d'inhibition la croissance mycélienne de <i>botrytis</i> en fonction des différents extraits .....	52
<b>Figure 24</b> : histogramme de pourcentage d'inhibition la croissance mycélienne de <i>Fusarium sp</i> en fonction des différents extraits .....	52
<b>Figure 25</b> : Effet de concentration (mg/ml) d'ER avec le plasma sur le TQ (s).....	54
<b>Figure 26</b> : Effet de concentration (mg/ml) d'ER avec le plasma sur le TCK (s).....	55

**Figure 27** : Effet de concentration (mg/ml) de RHO et de HO avec le plasma sur le TQ (s) ..... 56

**Figure 28** : Effet de concentration (mg/ml) de RHO et de HO avec le plasma sur le TCK (s).... 56

**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Classification de genre Pinus .....	4
<b>Tableau 2</b> : réparation de pin d'Alep en Algérie .....	5
<b>Tableau 3</b> : classification botanique d'olivier .....	9
<b>Tableau 4</b> : Composition en acides gras de l'huile d'olive .....	11
<b>Tableau 5</b> : Les principaux triglycérides de l'huile d'olive .....	12
<b>Tableau 6</b> : Structure des principales classes des flavonoïdes .....	17
<b>Tableau 7</b> : screening phytochimique .....	31
<b>Tableau 8</b> : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.....	38
<b>Tableau 9</b> : Résultats de screening phytochimique de l'extrait n-hexane de la résine de pin (ER). .....	45
<b>Tableau 10</b> : teneurs en polyphénol totaux des extraits étudiés .....	47
<b>Tableau 11</b> : Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne.....	50
<b>Tableau 12</b> : Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique.....	51
<b>Tableau 13</b> : Résultats de l'activité anticoagulante de la résine.....	54
<b>Tableau 14</b> : Résultats de l'activité anticoagulante de RHO et HO.....	55

## Liste des abréviations

- °C : Degré Celsius.
- µl : Microlitre.
- *B. subtilis* : *Bacillus subtilis*.
- cm : Centimètre.
- D<sub>1</sub> : Dilution 1.
- D<sub>2</sub> : Dilution 2.
- D<sub>3</sub> : Dilution 3.
- D<sub>4</sub> : Dilution 4.
- DMSO : Diméthyle sulfoxyde.
- DO : Densité optique.
- DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
- *E. Coli* : *Escherichia coli*.
- EAG : Equivalent acide gallique.
- EPHO : Extrait des polyphénols de l'huile d'olive.
- EPRHO : Extrait polyphénoliques du macérât de la résine dans l'huile d'olive.
- ER : Extrait n-hexane de la résine
- FCR : Folin Ciocalteu
- FeCl<sub>3</sub> : Chlorure ferrique.
- g : Gramme.
- h : Heur.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Acide sulfurique.
- HCl : Acide chlorhydrique.
- HO : huile d'olive
- Kg : Kilo gramme.
- MeOH : Méthanol.

- **mg** : Milligramme.
- **MH** : Mueller Hinton
- **min** : Minute.
- **ml** : Millilitre.
- **mm** : Millimètre.
- **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium.
- **NaOH** : Hydroxyde de sodium.
- **PDA** : Potato Dextrose Agar.
- **RHO** : macérât de la résine dans l'huile d'olive.
- **Rpm** : Rotation par minute
- **S** : seconde.
- ***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*.
- **SM** : Solution mère.
- **TCK** : Temps de céphaline kaolin.
- **Tm** : Témoin.
- **TP** : Taux de prothrombine.
- **TQ** : Temps de Quick.
- **UV** : Ultra-violet.

# *Introduction*

Depuis l'aube des temps, l'Homme n'a cessé de chercher à subvenir de ses besoins en puisant dans la nature qui lui assure non seulement ses besoins nutritionnels et vestimentaires mais également médicamenteux.

Au cours du temps, les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Ainsi, jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétale. Ce n'est qu'à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle que les médicaments s'inscrivent dans une logique scientifique.

Dans un premier temps, on a découvert que les plantes renfermaient plusieurs constituants, la première substance médicinale pure dérivée des plantes était la morphine, qui a été extraite du pavot au début du 19<sup>ème</sup> siècle (**Simmonds, 2003**).

Avec l'isolement des premiers principes actifs avec les progrès de la chimie aux 18<sup>ème</sup> et 19<sup>ème</sup> siècles, l'histoire du rôle thérapeutique des plantes est aussi longue que l'histoire de l'humanité elle-même (**Quentin-Leclerc, 2002**) Actuellement, environ 25 % des médicaments modernes sont développés à partir de plantes (**Liu et Wang, 2008; Newman et Cragg, 2007**).

A l'heure actuelle, environ 25-30% de tous les médicaments, disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) (**C, S, Nergard et al. 2005**).

Parmi les plantes médicinales, le pin est très important pour ses bienfaits. On peut citer *Pinus sylvestris*, un arbre forestier économiquement important considéré comme une source de composés bioactifs aux propriétés médicinales (**Alfredsen et al, 2008**). *Pinus pinea* est cultivé pour ses pignons comestibles et comme arbre d'ornement, souvent planté dans les jardins et les parcs. Son huile essentielle est utilisée pour diverses affections cutanées, plaies, brûlures, dans des bains de vapeur aux herbes et dans divers inhalateurs (**Demirci et al., 2015**). Les composants de l'écorce de pin sont d'importants antioxydants ; ils n'empêchent pas le vieillissement, qui est un processus biologique génétiquement programmé, mais préviennent, réduisent ou inhibent les divers effets néfastes du vieillissement causés par l'excès de radicaux libres (**Masquelier, 1997**). Les sesquiterpènes et les éthers d'oxime de carbonyle dérivés du longifolène dans le pin des marais ont une activité anti-moustique importante (**Mir et al., 2018**).

Selon les régions et les maladies, le pin a plusieurs usages en Algérie. Le pin est bénéfique pour le tractus gastro-intestinal (**Benarba et al., 2015**), le système respiratoire, le système urinaire et stimule les glandes surrénales. Il est utilisé comme antiseptique et est recommandé pour traiter les bronchites, les pneumonies et les rhumes (**Rebbas et al, 2012**) ; le pin possède également des propriétés antifongiques (**Chermat et Gharzouli, 2015**).

En effet, la résine de pin utilisée dans des recettes en médecine traditionnelle, parmi lesquelles le macérât de l'huile d'olive, dans laquelle utilisée comme remède d'hiver dans les maladies bronchiques (usage externe ou interne mais pour les adultes avec des petites quantités).

Dont, un macérât huileux est le résultat de la macération de parties de plante dans une huile végétale. Selon la plante et la partie de plante choisie, le macérât peut avoir différentes actions, assurées par les molécules proviennes de la plante, ainsi que celles de l'huile utilisée.

L'objectif de notre travail consiste à réaliser une étude comparative phytochimique et biologiques entre le macérât huileux de la résine et ces constituants, la résine de pin et l'huile d'olive.

La première partie de ce travail consiste en une partie bibliographique, sur la résine de pin, huile d'olive, métabolites secondaires et les activités biologique étudiée dans ce travail.

La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale qui porte sur :

- ✓ La préparation de l'extrait de la résine de pin dans le n-hexane et dans l'huile d'olive
- ✓ L'étude phytochimique « screening phytochimique et dosage des polyphénols » de l'huile d'olive et les extraits préparés
- ✓ L'évaluation des activités biologiques (antioxydant, antibactérienne, antifongique et anticoagulante)

La troisième partie présente les différents résultats obtenus ainsi que leur discussion.

*Chapitre I : synthèse  
bibliographique*

## I. Résine de pins

### I.1. Généralité sur les pins

Le pin est un terme général pour les arbres appartenant au genre *Pinus*. L'origine du nom *Pinus* vient du mot "fosse", qui est un mot indo-européen faisant référence à une résine. Les pins sont des gymnospermes de la famille des pinacées. C'est le plus important de tous les conifères. Le nombre de ses espèces (plus de 90 espèces) se caractérise par la phyllotaxie unique et dite des forêts qu'elle compose, et par l'utilisation intensive du reboisement et l'importance économique de ses produits (Judd et al. 2002).



Figure 1 : Le pin d'Alep

### I.2. Description botanique

- Les feuilles sont de divers types :
  - a. feuilles en aiguille
  - b. Feuilles primordiales
- Les organes reproducteurs sont unisexués, les deux sexes sur le même arbre (genre monoïque), la pollinisation est toujours anémophile, jamais entomophile.
- L'écorce et le bois sont produits par une assise unicellulaire, le cambium, située juste sous l'écorce.

### I.3. Classification

Tableau 1 : Classification de genre *Pinus* (Gaussen et al., 1982)

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétale
embranchement	Spermaphyte

<b>Sous embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Classe</b>	Coniférophytes
<b>Ordre</b>	Pinales
<b>Famille</b>	Pinaceae
<b>Genre</b>	Pinus

Les Pinus sont connus localement sous le nom vernaculaire de: Senouber الصنوبر  
(Lucienne, 2010).

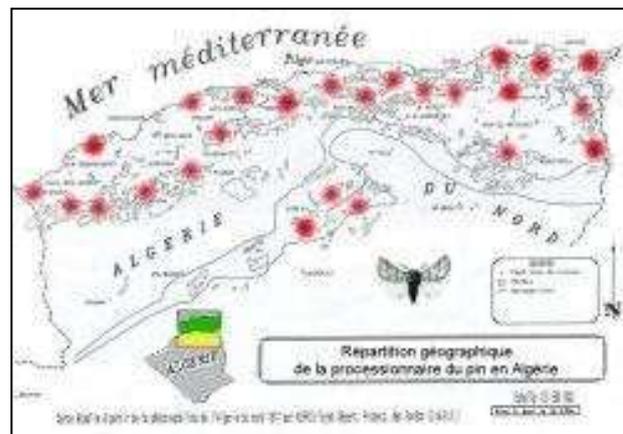
#### I.4. Répartition géographique

Sa répartition géographique est très vaste. On les trouve dans des régions assez variées, mais surtout dans les zones à climat tempéré-froid de l'hémisphère boréal (Algérien, Tunisie, Morocco, France, Espagne, Italie, les Balkans...etc.) où ils occupent tous les étages de végétation, du niveau de la mer jusqu'à la limite supérieure des forêts, même en terrain en permanence gelé (Techno-Science.net, n 1037632, 2004).

L'inventaire foncier et forestier de l'Algérie en 1984 est estimé à 1 128 664 hectares. Superficie occupée par les principales espèces forestières ligneuses ciblées économiquement. Parmi ces espèces, le pin d'Alep occupe 881 300 ha.

**Tableau 2 : répartition de pin d'Alep en Algérie (Bentouati ,2006)**

Région	Superficie (ha)
<b>Djurdjura</b>	<b>36,000</b>
<b>Tebssa</b>	<b>90,000</b>
<b>Medéa, Bogher</b>	<b>52,000</b>
<b>Aurès</b>	<b>100,000</b>
<b>Theniet el hed</b>	<b>47,000</b>



**Figure 2 :** La répartition géographique de pin en Algérie

### I.5. Résine de pin

Les résines végétales sont des substances naturelles sécrétées par certaines plantes. Ils se présentent sous la forme de liquides collants qui sèchent plus ou moins rapidement au contact de l'air.

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

Les résines peuvent se classer en deux catégories : les dérivés d'esters de colophane et des polymères issus de la chimie pétrolière. La colophane était extraite par les conifères (pin), utilisées dans les encres d'imprimerie sous forme dimérisée ou polymérisée. (Meullemiestre, 2014).



**Figure 3 :** la résine de pin

#### I.5.1. Composition de la résine de pin

La résine contient principalement des terpénoïdes, des flavonoïdes et des acides gras (<https://cueilleurs-sauvages.ch/onguent-a-la-resine-de-pin/>). Un tiers de son poids est constitué d'huiles essentielles, dont les propriétés de la résine sont les mêmes que celles C'est une huile essentielle, mais moins puissante en raison de sa plus faible concentration. Lorsqu'elle est

chauffée, la partie dure et insoluble est appelée colophane et la partie liquide et aromatique est appelée térébenthine.

### **I.5.2. Types de la résine de pin**

- **Oléorésine** : si elle est associée à des huiles essentielles: « pins, sapin ».
- **Gomme-résine** : si elle est associée à une gomme soluble dans l'eau: « aloé, myrrhe » oliban.
- **Baume** : si la résine est associée à des essences et des acides aromatiques: « baume du Tolu, benjoin, styrax ».

### **I.5.3. Synthèse et distribution de la résine dans l'arbre**

Les résines sont des mélanges complexes de terpènes de la famille Abietan et d'acides résiniques dont les proportions varient selon les espèces et l'origine géographique (**Joye et Laurent, 1967**). Synthétisé et préservé par les arbres, il peut être considéré comme un système de défense contre les fissures mécaniques du bois (**Cheniclet et al, 1987**). pour le protéger des agressions extérieures telles que l'attaque des champignons ou des insectes (**Croteau et al, 1987**).

La synthèse de résine se produit dans l'aubier par une fine couche de cellules tapissant les conduits de résine et formant un tissu épithélial.

Ces canaux mesurent environ 90 à 300 µm de diamètre chez le pin et peuvent être divisés en deux groupes selon leur orientation dans le tissu de l'arbre : « tubes en résine axiaux et radiaux » (**Ferreira and Filho, 2012; Sander et al., 2003**).

### **I.5.4. Récolte de la résine**

La production annuelle de résine par arbre peut varier d'environ 1 kg à 6 kg, selon l'arbre et sa zone géographique. Certaines caractéristiques dendritiques d'un arbre peuvent augmenter son rendement, comme le diamètre et la fréquence des canaux de résine (0,4 à 1,1 canal/mm<sup>2</sup>) (**Rodríguez-García et al., 2014**).

La récolte effectuée tout simplement sur les zones endommagées sur le pin. Parce qu'il y a une production de résine là-bas. La résine durcit lorsqu'elle sèche, mais se ramollit lorsqu'elle est chauffée. Avant de couper l'écorce de pin pour la sève, il faut rechercher d'abord les branches endommagées ou tombées. S'il faut endommager l'arbre, seulement dans une petite zone d'un côté. De plus, ne prendre que ce dont vous avez vraiment besoin et laissez l'excédent sur l'arbre pour le protéger des parasites.

La résine est récoltée en été, ce qui prend environ 6 mois. En effet, une diminution de la synthèse de résine est observée en hiver ; ceci est dû à une baisse de température qui réduit l'activité des cellules sécrétrices et augmente la viscosité de la résine (**Blanche et al., 1992**).

Le gemmage "traditionnelle" est une opération qui consiste à faire une plaie dans l'écorce afin que l'écorce sécrète de la résine pour recueillir la résine. Lors du taraudage traditionnel, il faut faire attention avec un outil spécial appelé hapchôt (**Eshete et al., 2012**) . De cette plaie la résine s'écoule vers un pot en terre cuite placé au fond du soin et pris en sandwich entre des lamelles de zinc et des clous (**Rodríguez-García et al., 2016**) . Un produit acide (généralement de l'acide sulfurique) est déposé sur la plaie pour empêcher la cicatrisation, stimuler la production de résine et augmenter la durée de la décharge, limitée à quelques jours dans les conditions naturelles.



**Figure 4** : Le gemmage traditionnel

### **I.5.5. Utilisation thérapeutique de la résine de pin**

De nombreuses enquêtes ethnobotaniques ont indiqué l'utilisation des pommes, des feuilles, de l'écorce et de la résine de *P. halepensis* Mill., en médecine traditionnelle. La résine sert comme antidiabétique et pour traiter les ulcères du tube digestif et les blessures. La résine de pin a des effets diurétiques, émoullients, stimulants, antiseptiques, anthelminthiques, insecticides, désinfectants, cytotoxiques, antibactériens, antifongiques, spasmolytiques, cicatrisants,... . (**Shuaib et al., 2013**).

En effet, en Algérie la résine est utilisée pour traiter les affections des voies respiratoires et urinaires (**Benderradji et al., 2015**). la parasitose délirante, comme antiseptique, antifongique et stimulant des glandes surrénales, Les populations du Maroc utilisent aussi la résine de *P. halepensis* Mill., sous forme de poudre contre les troubles digestifs, respiratoires, cutanés, circulatoires et génitaux. Comme c'est le cas de la majorité des pays méditerranéens, en Espagne

la gomme, la résine, les feuilles et le pollen sont utilisés comme expectorants et contre les abcès (Miara et al., 2019).

En outre la résine de pin est utilisée en poudre, mélangée avec du miel pour soigner les maladies de l'estomac et des intestins en Turquie. Elle est aussi mâchée pour nettoyer la bouche et les dents et pour éviter la mauvaise haleine (Satil et al., 2011).

## II. Huile d'olive

### II.1. Généralité sur l'olivier

L'olivier a été cité dans des livres à plusieurs reprises. Dans le coran, l'olive a été mentionné six fois dans différents endroits parmi lesquels un verset coranique cité au début de la sourate « Al-tine » (Labdaoui D., 2017).

La culture des oliviers, ainsi que la production et l'utilisation d'huile d'olive ont été des pratiques bien connues et établies dans la région méditerranéenne depuis de 7000 ans (Tsagaraki E. et al., 2007).

Selon la légende, c'est Isis, femme d'Osiris, qui aurait enseigné aux égyptiens la technique d'extraction de l'huile. En Algérie, l'oliveraie n'a pas retrouvé son deuxième souffle d'adaptation aux nouvelles techniques de production, à l'instar de ses deux pays voisins (Tunisie et Maroc) qui ne cessent de renouveler les techniques de plantation sur des nouvelles bases de l'oléiculture ou la rentabilité est prise en considération (SlamGaour M.,2004).

### II.2. Classification botanique d'olivier

D'après Emberger (1960) ; Gausson (1982) ; Cronquist (1988) ; Argenson et al. (1999), l'olivier à comme classification :

**Tableau 3** : classification botanique d'olivier

Règne	Végéta
<b>Embranchement</b>	Phanérogames
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous R classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Gentianales
<b>Famille</b>	Oleaceae
<b>Genre</b>	Olea
<b>Espèce</b>	Olea europea

## II.3. Répartition géographique des oliviers

### II.3.1. Répartition dans le monde

Le nombre mondial d'oliviers est évaluée à 784 millions, dont 754 Millions dans le bassin méditerranéen. L'Europe représente 66% du verger oléicole mondial, l'Asie méditerranéenne (17%), et LE MAGHREB (14%) ; On trouve des oliveraies en Chine, Australie, Etats-Unis, Afrique du sud..., et surtout en Argentine. (Sidhoum M., 2011).

### II.3.2. Répartition en Algérie

L'oléiculture est concentrée au niveau de sept principales wilayas (Bejaïa, TiziOuzou, Bouira, Guelma, Jijel, Sétif et Mascara) dont la région centre représente un taux de plus de 75% de la superficie oléicole globale de ces sept wilayas (ANDO, 2018). Notant que la production d'huile d'olive en Algérie est estimée de 80 000 tonnes durant la campagne 2017-2018.

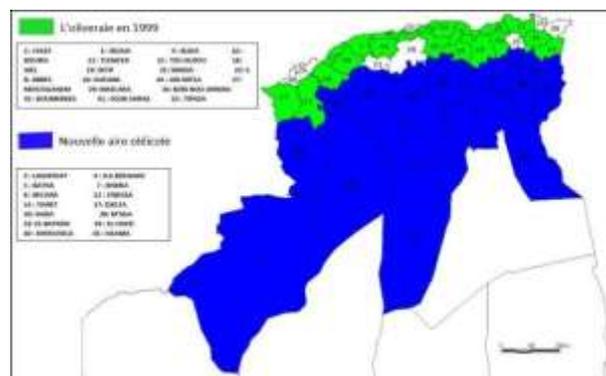


Figure 5 : Carte oléicole d'Algérie (ITAF, 2008).

## II.4. Olive

L'olive est une drupe ovale constituée d'un péricarpe (exocarpe et mésocarpe) et d'un endocarpe (fosse) (Ghanbari R. et al., 2012).

La paroi du fruit est constituée de l'exocarpe (péricarpe) fermement attaché à la pulpe (Fig. 06). A maturité, l'exocarpe passe du vert tendre (olive verte) au violet ou rouge (olive) puis au noir (olive noire) (Fedeli E., 1997, Bianchi G., 2003).

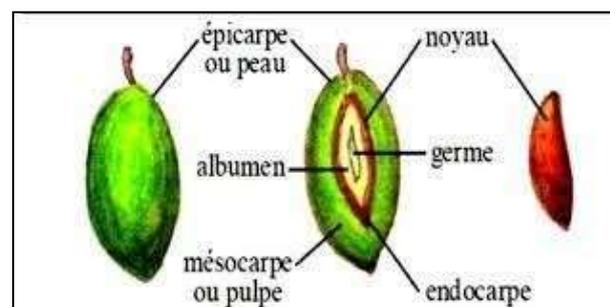


Figure 6 : Différentes parties de l'olive (Amourettim C. et al., 2000).

## II.5. Huile d'olive

L'huile d'olive est le jus extrait de l'olive, Le traitement des olives en vue de l'extraction de l'huile peut se faire par des moyens mécaniques (par pression ou centrifugation) ou bien des méthodes traditionnelles (**Boulkroune H., 2018**).

### II.5.1. Composition chimique de l'huile d'olive

La composition chimique de l'huile d'olive (*Olea europaea*, L.) dépend largement de la variété du fruit, des conditions agronomiques, du degré de maturité, des procédés d'extraction et des conditions de stockage (**Cichelli et Pertesana, 2004**).

Les composants de l'huile d'olive sont souvent classés en deux catégories : la fraction saponifiable et la fraction insaponifiable.

#### A. Fraction saponifiable

La fraction saponifiable est constituée d'acides gras et de leurs dérivés. Elle représente environ 99% de l'huile et lui confère la plupart de ses caractéristiques physiques, chimiques et métaboliques (**Ryan D. et al., 1998**).

Les différents constituants de cette phase sont :

#### ➤ Acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques qui contiennent de longues chaînes **grasses** non ramifiées. Les acides gras sont classés selon leur structure et leurs propriétés chimiques en (AGS), (AGMI) et (AGPI) selon la présence ou non d'une ou plusieurs doubles liaisons dans leurs chaînes carbonées (**Lopez S. et al. 2014**). Le tableau représente les principaux acides de l'huile d'olive.

**Tableau 4** : Composition en acides gras de l'huile d'olive (**Amanda L. et al., 2010**)

Acide gras	Formule	Pourcentage %
<b>Acide oléique</b>	C18:1 Δ9	<b>55-83</b>
<b>Acide linoléique</b>	C 18:2 Δ6	<b>35-21</b>
<b>Acide palmitique</b>	C 16:0	<b>7,5-20</b>
<b>Acide stéarique</b>	C 18:0	<b>0,5-5</b>
<b>Acide palmitoléique</b>	C 16:1 Δ7	<b>0,3-3,5</b>
<b>Acide linoléinique</b>	C 18:3 Δ3	<b>≤0,9</b>

Acide arachidique	C 20:0	≤0,6
Acide gadoléique	C 20:1 Δ9	≤0,4
Acide margarique	C 17:0	≤0,3
Acide béhénique	C 22:0	≤0,2
Acide lignocérique	C 24:0	≤0,2
Acide mystérique	<b>C 14:0</b>	≤0,05

### ➤ Triglycérides

Ce sont des triesters d'acides carboxyliques et de glycérol (Murry, 1998) et sont les principaux constituants (89-99%) de l'huile d'olive (Doveri et Baldoni, 2007). Les triglycérides déterminent principalement les propriétés physicochimiques des huiles (Tlantikit, 1988). Les

Les principaux triglycérides présents dans l'huile d'olive sont représentés dans le tableau (Ruiz *et al.*, 1998).

**Tableau 5** : Les principaux triglycérides de l'huile d'olive (Ruiz *et al.*, 1998).

Nature	(%) des triglycérides
<b>OOO</b>	40-60
<b>POO</b>	10-20
<b>OOL</b>	10-20
<b>POL</b>	5-7
<b>SOO</b>	5-7

**O** : Acide Oléique, **L**: Acide Linoléique. **P**: Acide Palmitique, **S**: Acide Stéarique

### B. Fraction insaponifiable

Cette fraction représente environ 2 % de la composition totale de l'huile d'olive et comptent plus de 230 composés différents (Laribi R., 2015).

### ➤ Composés phénoliques

Ils sont de puissants antioxydants naturels. Ils sont en effet des pièges à radicaux libres, et bloquent par conséquent les réactions de propagation en chaîne de l'oxydation, les polyphénols

peuvent inhiber l'oxydation des lipides de façon indirecte en désactivant l'oxygène singulet, oxydant très puissant des acides gras insaturés, ou en chélatant les métaux de transition ( $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) qui accélèrent fortement l'autooxydation des lipides. Certains, enfin, sont des inhibiteurs des enzymes d'oxydation, en particulier la lipoxygénase ou la cyclo-oxygénase (**Pokorny J., 2003**).

➤ **Hydrocarbures**

Ce sont les principaux composants de la fraction insaponifiable. L'ingrédient principal est le squalène, qui représente 30 à 50 % de la portion. C'est une polyoléfine avec une teneur plus élevée que toute autre huile végétale ou animale. Le squalène est un précurseur métabolique du cholestérol et d'autres stérols (**Samaniego-Sanchez C. et al., 2010**).

➤ **Tocophérols**

Les tocophérols sont connus pour leurs doubles effets bénéfiques. En effet, ils présentent avant tout des avantages en tant que vitamines (vitamine E), et ils ont également une forte activité antioxydante (**Burton G. et al., 1986**). Les tocophérols courants dans l'huile d'olive sont : les tocophérols alpha, bêta, gamma et delta (**Beltrán G. et al., 2005**).

➤ **Stérols**

L'huile d'olive est la seule huile qui contient des niveaux particulièrement élevés de bêta-sitostérol, une substance qui bloque l'absorption du cholestérol dans l'intestin (**Osland R., 2002**). Les stérols sont des composés importants pour la stabilité de l'huile car ils agissent comme inhibiteurs de la polymérisation à haute température et fournissent des paramètres importants pour la détection de l'adultération des huiles (**Velasco J., 2002. García-González D. et al., 2007**).

➤ **Chlorophylles**

Les chlorophylles représentent un groupe de tétrapyrroles à magnésium, leurs teneurs varient de 0 à 20 ppm et elles sont responsables de la nuance verdâtre de l'huile d'olive (**Gandul-Rojas B. et al., 1996a**).

➤ **Pigments caroténoïdes**

Les pigments caroténoïdes surtout présents dans l'huile d'olive est le  $\beta$ -carotène. (**Nieves Criado M. et al., 2008**), ce sont des inhibiteurs très efficaces de la photo-oxydation induite par les pigments chlorophylliens (**Aparicio-Ruiz R. et al., 2012**) et sont utilisés par ailleurs comme étant des marqueurs pour la différenciation variétale et de l'origine géographique des cultivars (**Giuffrida D. et al., 2007**).

### **II.5.2. Intérêt nutritionnel et thérapeutique de l'huile d'olive**

Bien que l'huile d'olive ait longtemps été un ingrédient essentiel du régime méditerranéen. Pendant des milliers d'années, les propriétés médicinales de cette huile n'ont été découvertes que récemment obtenez une véritable reconnaissance (**Weil, 2005**).

L'huile d'olive est l'une des huiles les plus appréciées des consommateurs pour des raisons organoleptiques (riche en arômes et en saveurs), mais aussi pour des raisons de santé humaine comme agent préventif (**Pinelli et al., 2003; Samaniego-Sanchez et al., 2007**).

L'huile d'olive est riche en substances antioxydantes qui sont impliqués dans la protection contre certaines maladies : maladies cardiovasculaires, certains cancers et maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) (**Servili et al., 2004**). Ces maladies étant liées aux espèces réactives de l'oxygène impliquées dans le stress oxydant, syndrome au cours duquel les éléments pro-oxydants surpassent les capacités antioxydantes de l'organisme (**Pincemail et al., 2002**), il en résulte un déséquilibre entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers (**Moffarts et al., 2005**). En effet, l'huile d'olive conserve ses propriétés antioxydantes lorsqu'elle est cuisinée, jusqu'à 200 C° pendant 3 heures (elle ne s'oxyde pas à la friture), alors qu'on recommande de ne pas chauffer les huiles de graines (comme le tournesol ou le soja) au-delà de 160 C° (**Alonso et al., 2006**).

La vitamine E, les caroténoïdes et les composés phénoliques sont des antioxydants qui ont démontrés des effets considérables dans la prévention de certains maladies et de vieillissement (**Huang et al., 2008**).

Selon Berra (1998) et Giuffrida et al. (2006), les caroténoïdes sont considérés comme agents préventifs des maladies cardiovasculaires et réduisent les risques d'apparition des cancers. La lutéine et la zéaxantine préviennent les pathologies dégénératives et la formation de la cataracte (**Beltran et al., 2005**).

L'huile d'olive de part sa richesse en acides gras mono insaturés, principalement l'acide oléique, contribue à l'augmentation du taux des HDL, diminue et empêche l'oxydation des LDL, diminuant ainsi le risque d'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (**Jacotot et al., 1985**). La teneur élevée en acide oléique diminue le risque des cancers du sein, des ovaires, de l'estomac et du colon (**Owen et al., 2003**).

### **III. Métabolites secondaires**

#### **III.1. Généralités**

Le métabolisme chez les végétaux est un processus très dynamique caractérisé par une synthèse et une dégradation des molécules pour assurer un équilibre cellulaire parfait. Cependant, l'essentiel produit lors de ce métabolisme est orienté vers la synthèse de molécules vitales et impératives pour la structuration et le fonctionnement des cellules, ce sont les métabolites primaires tels que les protéines, les glucides, les lipides ainsi que les acides nucléiques (**Hopkins, 2003**), alors que d'autres voies de biosynthèse, dérivant du métabolisme, non essentiel à la survie de la plante sont connues sous le nom de métabolites secondaires (**Hartmann, 2007**).

Ces métabolites secondaires sont utiles dans l'interaction de la plante avec son environnement, étant considérés comme réponse aux différents facteurs de stress, ce qui permet le développement d'une résistance contre une attaque pathogène (**Sudha et Ravishankar, 2002**).

#### **III.2. Classification**

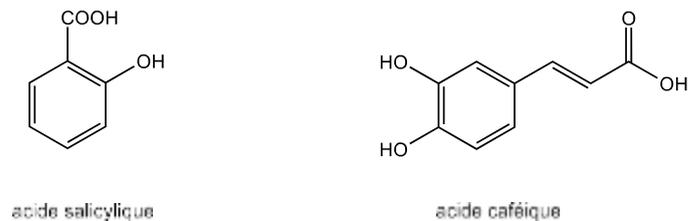
On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité en biologie humaine (**krief, 2003**).

##### **III.2.1. Composés phénoliques**

Les polyphénols constituent un groupe de substances ubiquistes et variées allant de molécules simples jusqu'à des structures très complexes (**Marouf et Reynaud, 2007**). Les composés phénoliques jouent un rôle important dans les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits végétaux car ils sont présents dans la plupart des organes et tissus utilisés ou consommés par l'homme (**Manchando et Cheyner, 2006**).

##### **A. Structure chimique**

Les polyphénols se caractérisent par la présence au moins d'un cycle aromatique à 6 carbones dans leur structure, lui-même porteur d'un nombre variable de fonction hydroxyles OH (**Hennebelle et al., 2004**). La structure et le nombre de noyaux aromatiques sont la base de la classification des composés phénoliques (**Bruneton, 2009**).



**Figure 7 :** structure de deux composés phénoliques de base; acide salicylique, acide caféique (Hannebelle *et al.*, 2004).

## B. Classification des composés phénoliques

### ➤ Acides phénoliques

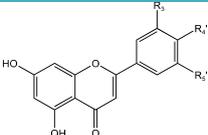
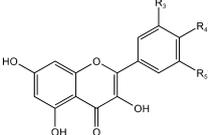
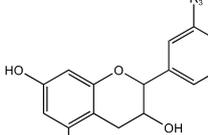
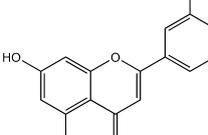
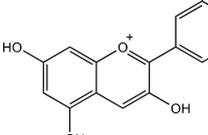
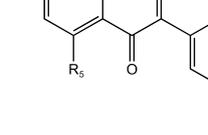
Ces composés sont dérivés de deux sous-groupes distingués : Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogénique. Et les acides hydroxybenzoïques, mais les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique. Sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales et présents chez toutes les céréales (Yezza et Bouchama, 2014).

Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prébiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est très faible car ils sont considérés non toxiques (Yezza et Bouchama, 2014).

### ➤ Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les feuilles, les graines, de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata *et al.*, 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane (Yao *et al.*, 2004).

Tableau 6 : Structure des principales classes des flavonoïdes (Narayana et al, 2001; werdman et al, 2007)

Classe	Structure chimique	R'3	R'4	R'5	exemple
<b>Flavones</b>		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
<b>Flavonols</b>		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
<b>Flavanols</b>		OH	OH	H	Catéchine
<b>Flavanones</b>		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
<b>Anthocyanidine</b>		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
<b>isoflavones</b>		R7	R5	R'4	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-glu	OH	Daidezine

➤ **Tannins**

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 g/mol qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les

fruits et les racines (Scalbert, 1991). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

✓ *Tannins hydrolysables*

Sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le d-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).

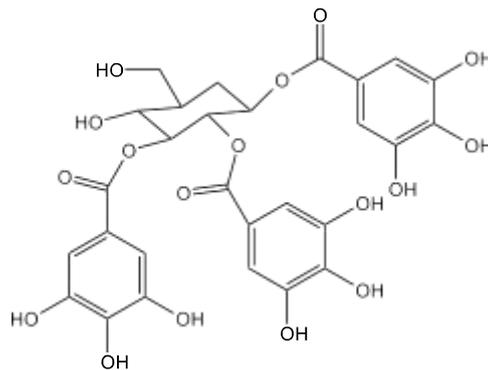


Figure 8 : structures chimiques de tannins hydrolysables

✓ *Tannins condensés*

Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4, C8 et C6 (Bruyne et al., 1999 ; o'connell et fox, 2001). Ils diffèrent fondamentalement des tannins galliques et ellagiques, ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et sont non hydrolysable (Paris et hurabiellem, 1981).

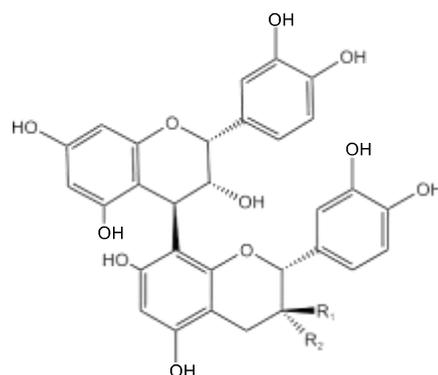


Figure 9 : Structures chimiques d'un tannin condensé

➤ *Les coumarines*

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché, à l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien, les familles les

plus riches en coumarines sont : Légumineuse, Rutacées, Apiécées et Thymelacées. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004).

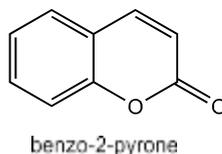


Figure 10 : structure chimique de coumarines (Muanda, 2010).

### III.2.2. Les terpénoïdes

Les terpènes constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organique des végétaux, avec près de 15.000 structures moléculaires connues. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui les composent ainsi que dans les divers modes d'assemblage, on distingue :

- les monoterpènes à 10 atomes de carbone.
- les sesquiterpènes à 15 atomes de carbone.
- les diterpènes à 20 atomes de carbone.
- les triterpènes à 30 atomes de carbone et les tétraterpènes à 40 atomes de carbone (Belbache, 2003)

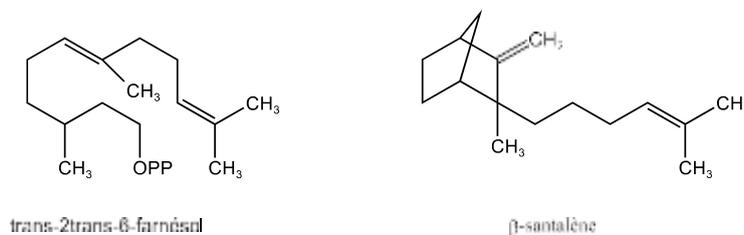


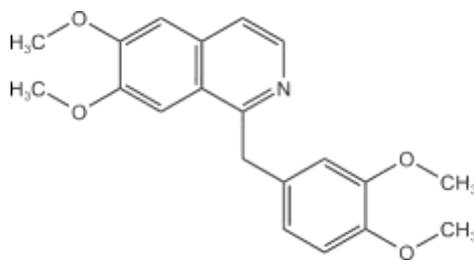
Figure 11 : structure des deux composés sesquiterpéniques.

### III.2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées, basiques, leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique (Bruneton, 1999). Cet atome d'azote provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde.

Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, ils affectent chez l'être humain le système nerveux, les alcaloïdes jouent plusieurs activités pharmacologiques: analgésique (cocaïne), anticholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine),

dépressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaïne), (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (éphédrine), plusieurs alcaloïdes servent de model pour la synthèse d'analogues avec des propriétés meilleures (**Bhat, 2005**).



**Figure 12** : structure chimique des alcaloïdes

## IV. Activités biologiques

### Généralité

Les produits végétaux sont particulièrement riches en métabolites secondaires qui exercent de multiples rôles biologiques. De nombreuses enquêtes épidémiologiques a été démontré que les fruits et légumes ont un effet préventif sur l'émergence de conditions médicales majeures. Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes et les tanins, constituent l'une des classes de micronutriments les plus abondantes.

Ces composés sont particulièrement intéressants à étudier en raison de leurs diverses propriétés biologiques telles que :

#### IV.1. Activité antioxydant

##### IV.1.1. Stress oxydant

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance oxydants /antioxydants est en équilibre. Cependant dans certains cas, en raison d'une surproduction radicalaire ou d'une diminution des capacités antioxydantes. Un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme appelé stress oxydatif (**Bendif, 2017**).

Les espèces activées de l'oxygène de part leur structure électronique instable peuvent attaquer les composants cellulaires. Les molécules biologiques : protéines, les lipides, glucides et l'ADN sont sujettes à l'attaque radicalaire, provoquant ainsi un dysfonctionnement dans les activités vitales des cellules à l'origine du développement de diverses pathologies (**Mohammedi, 2013**).

**IV.1.2. Radicaux libres**

Les radicaux libres sont des entités chimiques (Espèces, atomes, molécules ou des fragments moléculaires) possédant un électron (ou plus) non apparié « Célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron naît suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour se réappairier, qui a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité, déstabilisant ainsi d'autres molécules (**Bendif, 2017**).

**IV.1.3. Les antioxydants**

Sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou nonenzymatiques (**Mohammedi, 2013**).

Systèmes enzymatiques sont des systèmes de défense très efficaces. Selon Lehucher Michel, (2001) cette ligne de défense est constituée de Superoxyde dismutase (Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde), Catalase (Métabolise  $H_2O_2$ ), Glutathion peroxydase (Action réductrice sur  $H_2O_2$  et assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH) (**L.Michel, 2001**).

Systèmes non enzymatiques, comme les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et vitamines C (Acide ascorbique) et les polyphénols issus des végétaux (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...etc). La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (**Bendif, 2017**).

**IV.2. Activité antibactérienne**

Les antibiotiques sont des substances chimiques élaborées par des organismes vivants ou produits par synthèse chimique qui possèdent une activité antibactérienne. Cette activité se manifeste de manière spécifique par l'inhibition ou la modification de certain processus vitaux des micros organismes. En fonction de la molécule, de sa concentration et du temps de contact avec les bactéries, les antibiotiques peuvent les tuer (effet bactéricide) ou ralentir leurs croissance (effet bactériostatique). (**P.G.Guilfoile, 2000**).

Le traitement des infections bactériennes repose principalement sur l'utilisation d'antibiotique. La prescription généralisée et parfois inappropriée de ces médicaments peut conduire à la sélection de souches multirésistantes, guidant ainsi l'importance de la recherche vers la découverte de nouvelles voies qui constituent de nouvelles sources d'inspiration herbes

(Billing et Sherman, 1998), sous forme de métabolites les composés secondaires, dont les composés phénoliques, sont encore utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétiques et comme antiseptique dans la médecine populaire (Cowan,1999).

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, caractérisés par une absence de noyau et d'organites. La plupart des bactéries possèdent une paroi glucidique, le peptidoglycane. Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses comme le choléra, la syphilis, la tuberculose... (Nauciel, 2000).

Les bactéries peuvent être classées à l'aide de la coloration de Gram, qui distingue les deux types bactéries :

- **Bactéries Gram-positives** : les bactéries Gram-positives sont violettes en dessous microscope.
- **Bactéries Gram-négatives** : les bactéries Gram-négatives sont roses en dessous microscope.

#### IV.2.1. Souches bactériennes étudiées

##### A. *Escherichia coli*

*E. coli* est une bactérie à Gram négatif en forme bâtonnet, et classée comme un membre de la famille des entérobactéries de la classe des gammaproteobactéries. De nombreux systèmes de manipulation génétique ont été développés en utilisant *E. coli* comme bactérie hôte, produisant d'innombrables enzymes et autres produits industriels. En outre, étant donné que certaines souches et sérotypes d'*E.coli* peuvent causer des maladies humaines, comprendre l'écologie de cette bactérie est important pour prévenir infection et propagation de cet agent pathogène à la nourriture, au sol et à l'eau (Jang et al.,2017).

##### B. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* (Gram positif) est à la fois commensal (il colonise les narines, 20-40 % de la population générale sont porteurs) et pathogène (provoquant principalement des infections opportunistes des tissus mous, de la peau et des plaies, mais aussi des infections sanguines, ostéomyélite, arthrite septique, endocardite, pneumonie et septicémie) (Kozajda et al.,2019).

##### C. *Bacillus Subtilis*

Est une bactérie à Gram positif ubiquitaire du sol. Cette bactérie possède l'avantage d'avoir un génome entièrement séquencé, et est facile à manipuler génétiquement, ce qui favorise la compréhension des gènes impliqués dans la formation de biofilm (Zhu et Stülke, 2018).

*B. subtilis* est souvent retrouvé dans la rhizosphère, connue comme étant la région qui se retrouve autour des racines de plante. La rhizosphère est riche en sécrétions végétales, qui fournissent des nutriments aux bactéries et favorisent leur croissance. Cette abondance de nutriments permet aux « plant growth promoting rhizobacteria » (PGPR) comme *B. subtilis* de coloniser les racines et ainsi favoriser la croissance de la plante. Étant donné que cet environnement supporte la colonisation de *B. subtilis* sur les racines, il y a formation de biofilm à la surface de celles-ci (Mielich-Süss et Lopez, 2015 ; Vlamakis et al., 2013 ; Beaugard et al., 2013).

### IV.3. Activité antifongique

#### IV.3.1. Les antifongiques

Sont des substances (naturelles) capables de détruire sélectivement ou non les différents champignons rencontrés en mycologie. Ils s'administrent par voie locale ou générale (O'fel, 1982).

#### IV.3.2. Les champignons

Les champignons sont des microorganismes classés en trois groupes par rapport à leur importance industrielle : les champignons filamenteux, les levures, les champignons supérieurs (Antonio, 1998). Les champignons se distinguent des plantes par l'absence de chlorophylle.

C'est un être vivant hétérotrophe qui se nourrit de matière organique vivantes ou mortes en sécrétant des enzymes à travers ses parois cellulaires. Ils contiennent également des cellules cylindriques allongées, les hyphes, qui peuvent mesurer 0,1mm de longueur et 0,01mm les hyphes forment en semble « le mycélium », qui s'étend dans la terre, le bois ou tout autre substrat (Knudsen & Etersen, 2003). Leur paroi cellulaire contient typiquement de la chitine et du glucan. Plus de 100 000 espèces connues, elles sont pour la plupart saprophytiques; moins de 0,5 % sont reconnus pathogènes, Ils peuvent se reproduire de façon sexuée ou asexuée (Dufresne, 2018).

#### IV.3.3. Les champignons phytopathogènes

Les champignons phytopathogènes ou dites telluriques constituent un groupe d'organismes microscopiques hétérotrophes ubiquistes, qui présentent des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées (Kirk et al., 2001). Ils établissent des interactions antagonistes avec les plantes (Vander, 2003). Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines de plantes ainsi que les autres parties et même le fruit (Abdelkader, 2012). Dans cette catégorie de champignon on peut trouver les *Aspergillus*, les *Penicillium*, les *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Pythium*, *verticillium...etc.*

L'ensemble de ces microorganismes provoquent des maladies sur diverses cultures maraîchères, céréales, plantes (Agrios, 2005).

#### IV.3.4. Champignons phytopathogènes utilisés

##### A. *Botrytis cinerea*

Est un champignon polyphage capable d'attaquer plus de 230 espèces de plantes (Jarvis, 1980). Il affecte de nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ, comme par exemple: le raisin, la pomme, la poire, la cerise, la fraise et le kiwi en production fruitière, l'aubergine, la carotte, la laitue, le concombre, le poivron, la tomate, la courgette en production légumière ou des plantes ornementales comme la rose, le gerbera ou le cyclamen. Ce champignon est responsable de lourdes pertes économiques sur de nombreuses cultures (Gullino, 1992).

*Botrytis cinerea* est l'agent responsable de la pourriture grise. Cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et dans certains cas de la récolte. Sur le plan économique, ce champignon est par exemple considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (Martinez et al., 2005). Il peut s'attaquer à différents stades de développement de la vigne et l'infection par les conidies peut se produire durant toute la saison de croissance: début d'inflorescence, floraison, véraison, stade végétatif et grappe (Kretschmer et al., 2007). On estime les pertes mondiales dues à *B. cinerea* sur vigne à 2 milliards \$ par an (Elmer and Michailides, 2004). De plus, le développement rapide et insidieux de *B. cinerea* engendre chaque année la destruction de récoltes sur des centaines d'hectares de cultures viticoles (Bolay and Pezet, 1987).

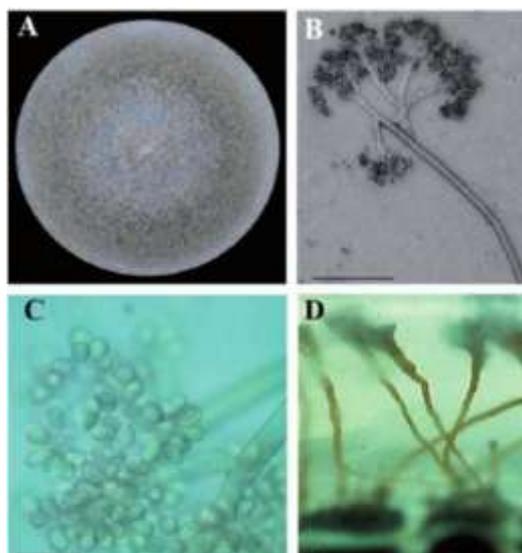


Figure 13 : *Botrytis cinerea*

### B. *Fusarium* sp

Les *Fusariums* sont des champignons filamenteux imparfaits (Deuteromycètes), qui comprennent plus de 100 espèces. Le genre *Fusarium* tire son nom du latin (*Fusus*) car ses spores sont en forme de fuseau, également décrites comme ayant une forme de canoë ou de banane (Desjardins, 2006). Le *Fusarium* est reconnu par son développement à divers substrats au champ notamment les sols (Dossa et al. 2019) ainsi que dans les récoltes de céréales (Nucci et al. 2007).

Le genre *Fusarium* présente une grande diversité morphologique. Le principal caractère qui permet de distinguer ce genre des autres est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (Nelson et al. 1994). Les espèces de *Fusarium* se différencient essentiellement par leurs macroconidies, microconidies ainsi que leurs chlamydospores. Ceci est complété par l'étude des phialides .

- Les macroconidies sont des spores pluricellulaires fusiformes plus ou moins courbées avec des extrémités apicales plus ou moins crochues et basales (arrondies, crochetées, effilées, crantées).
- Les microconidies sont de petite taille par rapport aux macroconidies, septées ou non (0 ou 1 septum, parfois 2 septa pour certaines espèces), souvent dispersées parmi le mycélium. Leurs formes sont diverses fusiformes, ovoïdes, ellipsoïdes, en forme de poire (piriforme) ou de rein.
- Les chlamydospores sont produites par certaines espèces. Elles sont formées seules, doublées, en bouquet ou en chaîne. Elles sont terminales ou intercalaires et différenciées par le mycélium ou par les conidies. • Phialides (monophialides, polyphialides) sont portées par l'extrémité du conidiophore. Elles sont étroites plus ou moins effilées.

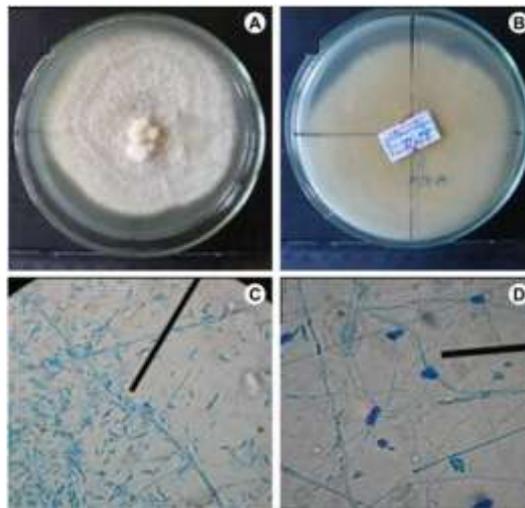


Figure 14 : *fusarium sp*

#### IV.4. Activité anticoagulante

##### IV.4.1. La coagulation

La coagulation est un processus complexe au cours duquel le sang liquide forme un caillot gélatineux. La coagulation peut suivre deux voies (Selverthorn et al., 2007) :

- **Voie endogène** : Dans cette voie de coagulation tous les éléments nécessaires de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII (Hageman) lors de ce contact aux structures électronégatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes), une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kalikréine qui à son tour peut activer le F XII. Le F XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX. Ce dernier se lie à la surface des phospholipides anioniques des plaquettes (F3P) par l'intermédiaire des ions de calcium et forme en présence de son cofacteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X (Colvin, 2004 ; Vogler et Siedlecki, 2009).
- **Voie exogène** : Cette voie est activée par un facteur non plasmatique qui est le facteur tissulaire, une glycoprotéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales et les cellules de la matrice sou-endothéliale.

Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui permet l'interaction avec le facteur VII (proconvertine) pour former un complexe enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII). Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquent de prothrombine en thrombine (Colvin, 2004). La thrombine formée par les deux voies catalyse la conversion de fibrinogène en monomères de

fibrine qui s'associent les unes aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (**Ajjan et Grant, 2006**).

#### **IV.4.2. Les tests de coagulation**

A l'aide de quelques tests de coagulation simples d'identifier les diathèses hémorragique plasmatique dans le cas du test de Quick diminué signifie que le F VII (système exogène) ou la cascade en aval du F X sont altérés ou encore perturbés par des antagonistes de la vitamine K. et le temps de thromboplastine partielle activé (APTT), on ajoute au plasma citrate (en plus du calcium) des céphalines et de du kaolin (substitut d'une activation de contact), et l'on mesure le temps de coagulation correspondant. S'il est allongé, la déficience est liée à l'activation endogène ou de nouveau à la partie terminale commune à partir du FX (**Silbernagl et Lang., 2003**).

#### **IV.4.3. Les troubles de la coagulation**

La thrombose se produit dans le monde entier à une incidence annuelle de 1 par 1000 adultes. Le traitement de la thrombose utilise des agents thrombotiques à activités anticoagulantes et antiplaquettaires (**Souza et al. 2015**).

Une thrombose est un caillot de sang (ou thrombus) qui se forme dans une artère ou une veine, de ce fait, on distingue deux types des thromboses : thromboses artérielles et thromboses veineuses, deux entités distinctes différentes entre elles dans les facteurs de risque, les mécanismes physiopathologiques et les manifestations cliniques (**Bautres, 2002 ; Corti Ret al., 2004**).

*Chapitre II :*

*Matériels et  
méthodes*

Ce chapitre expose les matières végétales utilisées, les protocoles d'extraction, ainsi que les tests d'évaluation des activités biologiques.

L'étude a été effectuée au niveau des laboratoires suivants :

- Laboratoire pédagogique de faculté des sciences de la nature et de la vie au centre universitaire Mila
- Laboratoire d'analyses médicales de Dr. Mirouh (Ferdjioua)
- Centre de recherche en biotechnologie (CRBt-Constantine)

## **I. Matériels**

### **I.1. Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de

- La résine de pin, qui a été achetées, en janvier 2023, chez l'herboristerie de la région de Ferdjioua.
- L'huile d'olive, acheté en décembre 2023 de la région de Rouached.

La résine a été broyée en poudre à l'aide d'un broyeur électrique



**Figure 15** : résine de pin poudre



**Figure 16** : huile d'olive

### **I.2. Matériels et réactifs :**

Les différents appareillages, verreries, réactifs et solvants sont regroupés dans le tableau (1) en annexe.

## **II. Méthodes**

Afin de préparer les deux extraits de la résine, nous avons procédé la méthode de la macération :

- ✚ Dans l'hexane

✚ Dans l'huile d'olive

➤ **Macération :**

La macération, connue comme une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules poly phénoliques qui sont sensibles aux changements de température (Spigno et De Faveri, 2007).

## II.1. Préparation des extraits

### II.1.1. Extrait de la résine (ER) :

- ✓ 25g de la résine de pin poudre a subi une macération dans le *n*-hexane, pendant 48h sous agitation, à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- ✓ Après la filtration en utilisant le papier filtre, l'extrait récupéré est concentré à une température n'excédant pas 40°C.
- ✓ Le résidu blanc obtenu pesé est conservé dans un flacon en verre fumé dans le réfrigérateur.

### II.1.2. Extrait du macéra la résine dans l'huile d'olive(RHO) :

- ✓ 250ml de l'huile d'olive ajouté à 25g de la résine de pin poudre puis chauffé au bain-marie à une température de 50°C pendant 15 min.
- ✓ Le mélange ensuite a agité pendant 48h à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- ✓ Après la filtration l'huile obtenue conservée dans un flacon en verre fumé dans le réfrigérateur.

➤ **Extraction des composés phénoliques :**

Pour extraire les composés phénoliques, nous avons adopté le protocole de (Pirisi et al. 2000). Brièvement, 04 g d'huile (HO et ERHO) ont été introduits dans un tube, additionnés de 2 ml *n*-hexane et 04 ml de méthanol 60%. Après homogénéisation, la mixture a été centrifugée pendant 05 min à 3000 tpm. Le surnageant (méthanol) contenant les polyphénols a été récupéré. Cette procédure a été répétée deux fois afin d'épuiser l'huile.

## II.2. Calcul de rendement de ER

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait brut à l'état sec et celle de la matière végétale utilisée, il est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = [(p_i - p_o)] / p \times 100$$

Avec :

**P:** Poids de la matière végétale sec (g).

**P<sub>o</sub>:** Poids de ballon vide (g).

**P<sub>i</sub>:** Poids de ballon après évaporation totale de l'extrait (g).

### II.3. Screening phytochimique :

Screening phytochimique ou criblage phytochimique est une étude qualitative visant la recherche des principaux groupes chimiques (tanins, alcaloïdes, flavonoïdes, saponosides et composés réducteurs) contenus dans un organe végétal (**Bammou, 2014**).

Les tests de caractérisation sont basés en partie sur l'analyse qualitative, soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration.

La méthode utilisée dans cette étude est celle adoptée par **Longaga et al., 2000. Tona et al. 2001**.

**Tableau 7 :** screening phytochimique

Métabolites secondaire	Le mélange réalisé	Le résultat recherché
<b>Flavonoïdes.</b>	2ml d'extrait de la résine a été avec quelques gouttes d'HCl à 2% +quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub> à 1%	Coloration verdâtre.
<b>Saponines.</b>	5ml d'extrait de la résine et agité dans le vortex pendant 1min, Laissé au repos pendant 20 min.	Une hauteur de mousse >1cm
<b>Quinones libres.</b>	2ml d'extrait + quelques gouttes de NaOH (1%).	Coloration jaune, rouge ou violète.
<b>Substances phénoliques.</b>	2ml d'extrait + une goutte de solution de chlorure ferrique (2%).	Coloration noirâtre ou verte plus ou moins foncée.
<b>Coumarines.</b>	2ml d'extrait + 3ml de NaOH à 10% Agitation du mélange	Coloration jaune

<b>Tanins condensés.</b>	2ml d'extrait + 1 ml d'eau + 1 à 2 gouttes de solution de FeCl <sub>3</sub> diluée à 1%.	Coloration bleu-noir.
<b>Protéine.</b>	2ml d'extrait + 1ml de NaOH à 2% après homogénéisation, ajoutées 2 à 3 gouttes de CuSO <sub>4</sub>	Coloration violette.
<b>Anthraquinones.</b>	10ml d'extrait + 5ml de NH <sub>4</sub> OH à 10%	Anneau rouge.
<b>Sucres réducteurs.</b>	5ml d'extrait + 5ml de la liqueur de Fehling. Après pour homogénéiser le milieu et chauffage pendant 2 à 3 min au bain-marie à 70°C.	Précipité rouge brique.

#### II.4. Dosage des poly phénols totaux :

##### II.4.1. Réactifs utilisés :

- ✓ FCR (Folin-Ciocalteu réactif)
- ✓ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 7,5% (Carbonate de sodium)
- ✓ Acide Gallique
- ✓ Nos extraits
- ✓ Eau distillée
- ✓ Méthanol

##### II.4.2. Principe

Le dosage est une méthode utilisée pour déterminer la teneur des composé phénoliques. Le contenu des composés phénoliques de nos extraits est estimé par la méthode folin Ciocalteu (Wong et al. 2006). Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 765nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

##### ➤ Préparation de l'extrait

- ✓ Une masse de 1 mg ER est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol.

- ✓ Un volume de 1ml de l'extrait phénolique (Pour EPRHO et EPHO)
- **Préparation de Folin-Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois:**
  - ✓ 1ml de FCR concentré (2M) et complété a 10 ml par l'eau distillé
- **Préparation de Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 7,5%:**
  - ✓ 7,5 gramme de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et sont dissouts dans 92,5 ml d'eau distillée.
- **Protocole expérimental :**
  - ✓ Une prise de 1 ml d'extrait de l'extrait dilué est mélangée avec 5 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué 10 fois.
  - ✓ Après une agitation vigoureuse suivie d'un repos de 3 min, une prise de 3.75 ml d'une solution de bicarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (7,5%) est additionnée.
  - ✓ Après une incubation du mélange réactionnel pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité.
  - ✓ La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 765 nm.
  - ✓ le blanc est préparé en parallèle de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé ((constitué de (FCR), de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%) et méthanol).
  - ✓ La détermination de la quantité des polyphénols de l'extrait des plantes étudiées doit être déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage préparée avec de l'acide gallique, le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg EAG/ g(extrait).

➤ **Gamme d'étalonnage**

La gamme standard est formulée avec de l'acide gallique a des concentrations variable 0,025, 0,05, 0,075, 01, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2 mg/ml.

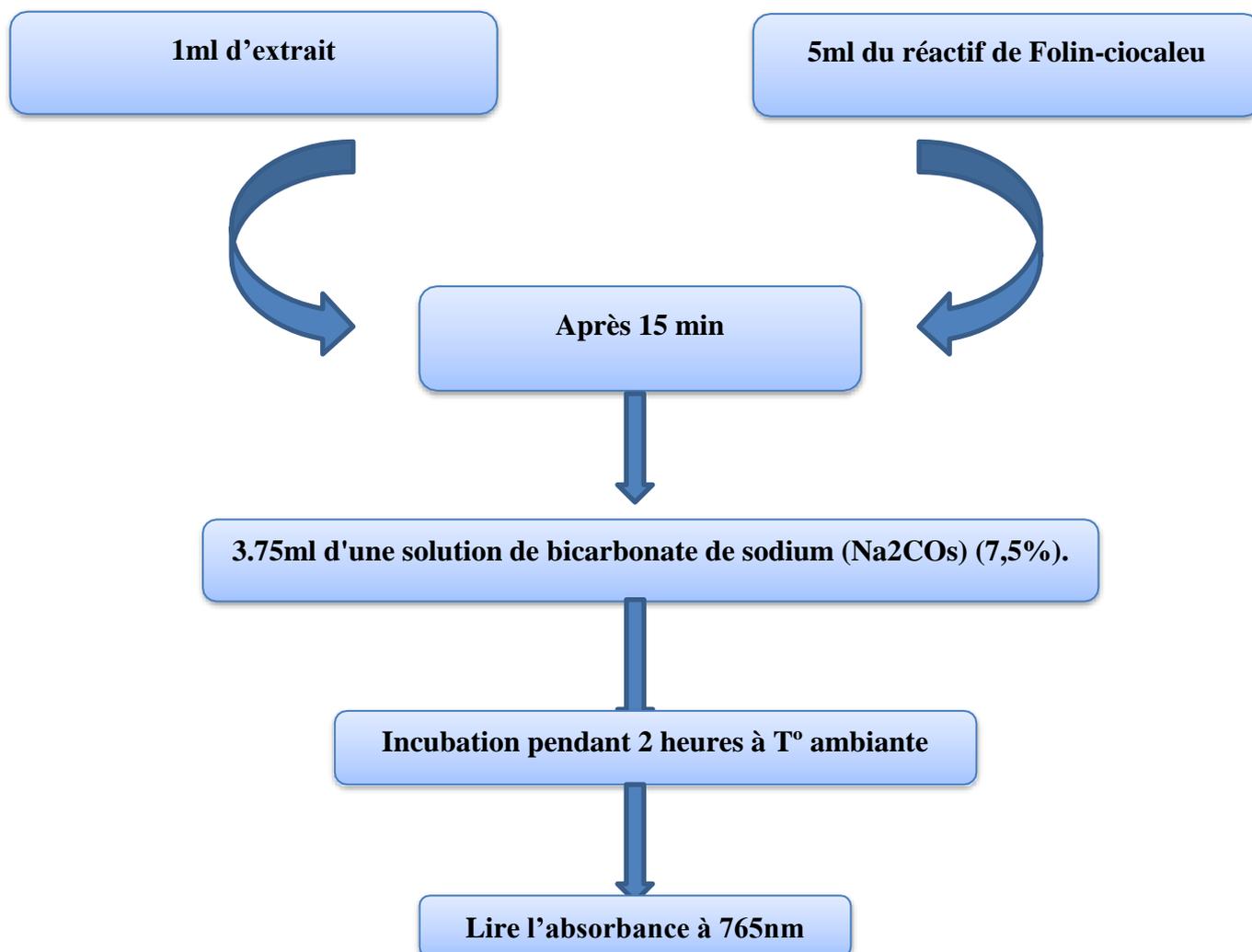


Figure 17 : protocole de dosages des polyphénols

## II.5. Evaluation des activités biologiques

### II.5.1. Activité antioxydants

#### A. Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre instable de couleur violette. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote et absorbe au maximum à 517 nm, sa réduction par un donneur de protons (antioxydant), conduit à l'apparition d'une couleur jaunâtre qui sera suivie par spectrométrie UV-Visible (Chandra Shekhar et Goyal, 2014).

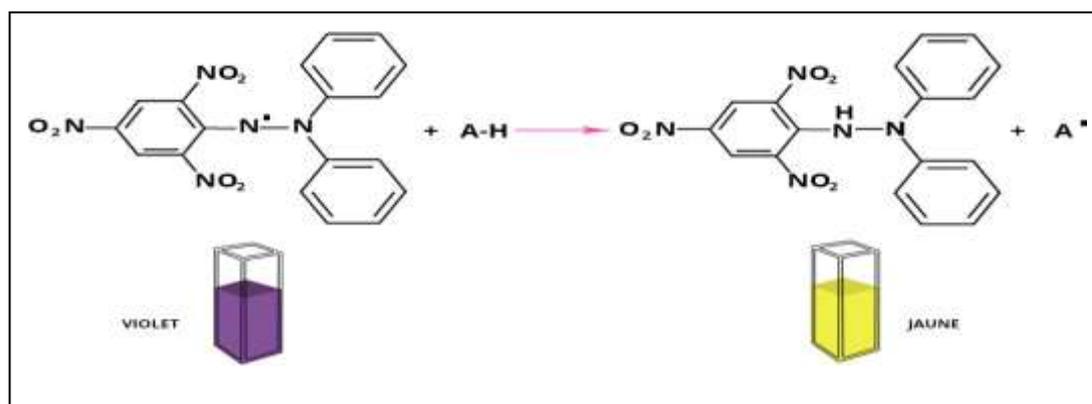


Figure 18 : principe de l'activité antioxydant

### B. Mode opératoire :

- Préparation de la solution de DPPH 100  $\mu\text{mol/l}$  : 4mg de DPPH ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$  : Mr 394,33), est solubilisé dans le MeOH absolu pour obtenir une concentration de 100  $\mu\text{mol/l}$ .
- Un volume de 1.5 $\mu\text{l}$  de chaque dilution a été ajouté à 1.5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.1 mmol/l).
- Un volume de 25 $\mu\text{l}$  ER de concentration (5mg/ml) et EPRHO, EPHO, est mélangé avec un volume de 2.5ml de solution méthanolique de DPPH (100  $\mu\text{mol/l}$ ).
- La décoloration par rapport au témoin, contenant le DPPH et le solvant, est mesurée au spectrophotomètre à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité.
- L'absorbance de chaque solution mesurée par rapport à un blanc.
- le blanc est préparé en parallèle de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé.
- l'absorbance en DPPH restent mesurée est convertit en pourcentage d'inhibition par la relation suivante :

$$I\% = ((\text{blanc-extrait})/\text{blanc}).100$$

**I%** : pourcentage d'inhibition.

**Extrait** : la densité optique du DPPH en présence de l'extrait à tester.

**Blanc** : la densité optique de DPPH dans la solution méthanolique.

### II.5.2. Activités antibactériennes

#### A. Principe

Cette activité a été réalisée au niveau de laboratoire d'analyses médicales de Dr. Mirouh (Ferdjioua).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de nos extraits a été réalisée selon la méthode de diffusion sur disques.

Les souches utilisées dans cette étude sont des bactéries pathogènes provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection)

Les souches utilisées sont :

Nom de souche	Gram	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538
<i>Escherichia Coli</i>	Négatif	ATCC 25922
<i>Bacillus Subtilis</i>	Positif	ATCC 6633

Les zones d'inhibition qui apparaissent autour des disques, sont mesurées après la durée d'incubation

➤ **Préparation du milieu de culture :**

Le milieu de culture la gélose Muller-Hinton (GMH) préparé comme suit :

- ✓ Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton (Annexe ) dans un litre d'eau distillée.
- ✓ Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète.
- ✓ puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C.
- ✓ laisser refroidir à 45-50 °C.
- ✓ finalement couler le milieu dans les boites de Pétri (L'épaisseur de la gélose est de 4 mm répartie uniformément dans les boites).

➤ **Préparation des disques**

Les disques préparés à partir du papier filtre de 6 mm de diamètre sont mis dans boîte en verre, et stérilisés à l'autoclave pendant 2h et 30 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante, en gardant la boîte hermétiquement fermée.

➤ **Préparation des différentes concentrations des extraits**

Pour obtenir des différentes concentrations de nos extraits, nous avons dilués les extraits purs dans le DMSO. Ce choix a été fait, parce que le DMSO est le solvant préférable pour la majorité des auteurs, qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antimicrobien puissant.

**ER:** 200mg a été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer la solution mère puis des différentes concentrations avec des dilutions successives au demi ont été préparées (100, 50, 25mg/ml).

Les huiles ont été utilisées pures avec une série de concentrations préparée avec des dilutions successives dans le DMSO (200, 100, 50, 25mg/ml).

➤ **Préparation des cultures bactériennes et ensemencement**

Les différentes souches bactériennes sont revivifiées par repiquage par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton, puis incubées à l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Des colonies pures sont prélevées à partir de ces cultures jeunes, pour préparer l'inoculum bactérien. Chaque colonie est mise en suspension dans 2.5 ml de bouillon Mueller-Hinton. La turbidité de la suspension est mesurée à l'aide d'un densitomètre et est ajustée à 0.5 du standard de McFarlane (DO= 0.08 à 0.1 mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 625$  nm), ce qui correspond à  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml.

L'ensemencement de l'inoculum est réalisé par écouvillonnage en effectuant des stries serrées sur la gélose préalablement versée (15 ml) et refroidie à 45-50°C dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre. Cette opération est répétée 3 fois en tournant la boîte de 60° pour obtenir une distribution égale de l'inoculum



**Figure 19 :** l'ensemencement de l'inoculum.

➤ **Imbibition des disques :**

Les disques de papier filtre de 6 mm de diamètre stériles, ont été chargés de 10  $\mu$ l l'extrait à tester (SM, D1, D2, D3). En parallèle, on a utilisé des disques imprégnés de DMSO qui vont servir de témoin négatif. Et des disques de gentamicine servir de témoin positif.

➤ **Antibiogramme :**

Les disques contenant les différentes concentrations des extraits étudiés ont été déposées après séchage, à l'aide d'une pince stérile, sur Les boîtes de Pétriensemencée. De même un disque témoin imprégné du DMSO a été déposé et autre de l'antibiotique dans les mêmes conditions. Chacune dans sa zone. Deux répétitions ont été faites pour chaque test.

➤ **Lecture des résultats**

La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition après 24 heures d'incubation à une température de 37°C, lesquelles représentés par une auréole claire formée autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité.

**Tableau 8 :** Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (**Pouce et al. 2003**).

Sensibilité	Zone d'inhibition
<b>Non sensible ou résistant (-)</b>	Diamètre < 8 mm
<b>Sensible (+)</b>	Diamètre compris entre 9 à 14 mm
<b>Très sensible (++)</b>	Diamètre compris entre 15 et 19 mm
<b>Extrêmement sensible (+++)</b>	Diamètre > 20 mm

### II.5.3. Activité antifongique

L'activité antifongique a été réalisée au niveau de laboratoire de mycologie de centre de recherche en biotechnologie Constantine (CRBt).

L'activité antifongique de nos extraits a été évaluée sur deux espèces fongiques sont :

- ✓ *Fusarium oxysporum f. sp* (Fol).
- ✓ *Botrytis cinerea*.

**A. Principe :**

L'inhibition de la croissance mycélienne a été déterminée en coupant des disques d'environ 6 mm de diamètre de bord d'une jeune colonie de culture de champignons et placer le disque au centre d'une boîte de Pétri sur PDA contenant l'extraits à tester préalablement stérilisés (**Bautista-Baños et al., 2002**).

Les boîtes déjà Incuber à température ambiante et l'expérience se termine une fois l'incubation terminée. Le contrôle (PDA sans extrait) a complètement colonisé la surface de la gélose. Le résultat est Exprimé en pourcentage d'inhibition de la croissance radiale dans le milieu. Les extraits ont été comparés à des témoins selon la formule de **Leroux et Credet (1978)**.

**B. Méthode :**

➤ Commercial *Fluconazole sandoz* a été évaluée en utilisant 1 g l-1 dans le milieu PDA. La lecture des antibiogrammes est faite après 4-7 jours d'incubation à 28°C.

➤ **Milieu de culture :**

Le milieu utilisé était le milieu PDA. La moisissure a été réactivé incuber à 28°C pendant 7 jours avant le test.

Le choix d'un milieu de culture est basé sur son adéquation pour un bon développement du pathogène. Etant donné qu'il s'agit des champignons hétérotrophes, un milieu de culture organique a été retenu. Il s'agit du milieu PDA (potato Dextrose Agar) dont la composition pour un volume de 1000 ml est ci-après :

- ✓ Pomme de terre 220 g.
- ✓ Agar 16.5 g.
- ✓ Glucose 22 g.
- ✓ Eau distillé 1100 ml.

La préparation de ce milieu est la suivante :

- ✓ éplucher, laver, couper en petites morceaux la pomme de terre.
- ✓ Cuire dans l'eau pendant 15 à 20 minutes.
- ✓ Ajouter 22g de Glucose et 16,5 Agar.
- ✓ Puis filtrer sur mousseline et presser.

✓ Autoclaver le mélange pendant 2h et 30 minutes à 120°C.

➤ **Préparation des dilutions** : ER a été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi (50, 25mg/ml), sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 100mg/ml.

➤ Pour les huiles (RHO, HO) nous avons utilisé seulement les huiles pures.

➤ **Préparation des disques**

Des disques d'un diamètre de 6 mm sont préparés à partir de la souche de champignons préalablement cultivée, sous la hotte et dans un milieu stérile, où chaque disque est placé directement au centre des boîtes de culture.

➤ **Pour ER**: un volume défini du milieu nutritif (PDA) a été bien mélangé avec chaque concentration de l'extrait de la résine de pin chaque (100, 50, 25mg/ml). Ensuite, chaque mélange a été versé dans quatre boîtes de Pétri stérilisées (7 cm de diamètre). Un disque mycélien activement grandissant est placé au centre de la boîte de Pétri. La croissance radiale du mycète après un temps approprié, selon les caractéristiques de croissance du champignon, est alors mesurée et comparée aux échantillons témoins (**Wilkinson, 2006**).

➤ **Pour les huiles** : 40 µl d'huile (RHO, HO), a été ensuite posé sur les disques.

➤ Les boîtes de contrôle positif ont été préparées en parallèle.

➤ **Lecture des résultats**

L'évaluation de la croissance radiale a consisté à tracer sur le couvercle de la boîte de Pétri deux droites perpendiculaires passant par le centre de disque mycélien. Les diamètres des colonies mycéliennes (en cm) sont mesurés. Un diamètre moyen est calculé. A partir des diamètres moyens des colonies, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition de chaque extrait en utilisant la formule de **Greche et Hajjaji (2000)**.

$$\text{Pourcentage d'inhibition } I\% = (C-T)/T \cdot 100.$$

**I%**= temps d'inhibition en pourcentage %.

**T**= croissance radicale de l'agent phytopathogène en mm sur un milieu PDA contenant l'extrait à tester.

**C**= croissance radicale de l'agent phytopathogène en mm sur milieu PDA (témoin).

### II.5.4. Activité anticoagulante

#### A. Principe

La coagulation est un processus complexe au cours duquel le sang liquide forme un caillot gélatineux. La coagulation peut suivre deux voies exogène endogène (Selverthornet *et al.*, 2007).

L'activité anticoagulant de nos extraits (ER, ERHO, HO) a été évaluée *in vitro* par des tests de coagulation, qui sont le temps Rapide (TQ) et le temps de céphaline-kaolin (TCK) à l'aide d'un coagulomètre sur un pool de plasma normal appauvri en plaquettes.

#### B. Méthode :

##### ➤ Préparation des différentes concentrations des extraits

- ✓ Pour ER : a été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi (10mg/ml, 50mg/ml, 25 mg/ml), sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 200 mg/ml.
- ✓ Pour les huiles : ont été utilisées pure avec des volumes différentes

##### ➤ Préparation de plasma pauvre calcium :

- ✓ Le sang est prélevé à partir des volontaires sains (Xi *et al.* , 2012)
- ✓ Le sang périphérique humain est obtenu par une ponction veineuse aseptique réalisée (Koko *et al.* , 2008).
- ✓ Les différents prélèvements sont récupérés dans des tubes citratés (citrate tris-sodique 3.8%) pour éliminer le calcium
- ✓ puis une centrifugation des échantillons pour obtenir un plasma pauvre en calcium

##### ➤ Teste anticoagulant

#### Extrait de la résine:

- ✓ Un volume de 20 µl de chaque dilution de l'extrait de la résine (200, 100, 50, 25mg/g) est ajoutée à un volume de 180 µl de plasma standard.
- ✓ Une formation d'un précipité a été observée, nécessite une autre centrifugation aux mélanges, pour séparer le caillot formé.



**Figure 20** : Formation de précipité.

- ✓ Puis les mélanges sont incubés à 37°C durant 15 min.
- ✓ **mesure du temps de prothrombine (TP)** : Un volume de 100µl de thromboplastine est additionné au mélange qui est réincubé durant 3 min sous agitation à 37°C°. Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre de type Biomérieux, les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (s). En parallèle, un control négatif de DMSO est réalisé dans les mêmes conditions (**Athukorala et al., 2007**).
- ✓ **mesure du temps céphaline-kaolin (TCK)** : on ajoute 50µl de réactif de le céphaline. Le mélange est incubé 3 min à 37°C°. Après l'ajoute de 50µl de CaCl<sub>2</sub> (0.025mol/l), le temps de céphaline (caolin) activée est enregistré, les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (s). En parallèle, un control négatif de DMSO est réalisé dans les mêmes conditions (**Athukorala et al., 2007**).
- ✓ **Témoin DMSO préparé à partir de** : 180µl de plasma + 20 µl de DMSO

#### **Extrait du macérât de la résine dans l'huile d'olive et l'huile d'olive pur :**

- ✓ 180µl de plasma humain normal citraté a été mélangé avec l'huile (huile d'olive, macéra de la résine dans l'huile de l'olive) à différents volumes des huiles (20, 40, 60µl).
- ✓ Incubation des mélanges à 37°C durant 15 min.
- ✓ **mesure du temps de prothrombine (TP)** : Un volume de 100µl de thromboplastine calcique est additionné au mélange, après une incubation durant 3 min sous agitation à 37°C°. Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre de type Biomérieux, les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (s). En parallèle, des témoins négatifs de physiologique est réalisé dans les mêmes conditions (**Athukorala et al., 2007**).

- ✓ **mesure du temps céphaline-kaolin (TCK) :** on ajoute 50µl de réactif de le céphaline. Le mélange est incubé 3 min à 37C°. Après l'ajoute de 50µl de CaCl<sub>2</sub> (0.025mol/l), le temps de céphaline (caolin) activée est enregistré, les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (s). En parallèle, des témoins négatifs de l'eau physiologique est réalisé dans les mêmes conditions (**Athukorala et al., 2007**).
  
- ✓ **Les témoins préparée par :** les mélanges de 180µl avec des volumes différents de l'eau physiologique (20, 40, 60µl).

# *Chapitre III : Résultats et discussions*

## I. Partie phytochimique

### I.1. Rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction a été calculé par rapport à la matière sèche de la résine de pin. Il est exprimé en pourcentage selon la relation :

$$R\% = [(P1-P0)/P] \times 100$$

- **P** : poids la matière végétale initial (g).
- **P0** : poids de ballon vide (g).
- **P1** : poids de ballon après évaporation totale de l'extrait (g).

Le résultat obtenu :

$$R(ER) \% = [(383.2-379.49)/25] \times 100 = 14.84\%$$

D'une manière générale, le rendement de la méthode d'extraction 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). Et aussi il dépend de nature du solvant utilisé (Zhao et al., 2006) et la méthode d'extraction appliquée (Wojdylo et al., 2007).

### I.2. Screening phytochimique

Dans notre étude nous avons réalisé des tests phytochimique de l'extrait de la résine de pin dans le *n*-hexane. Afin de mettre en évidence les différentes classes des métabolites secondaires constituants de cette résine.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait de la résine de pin sont regroupés dans le tableau ci-dessous (tableau 9).

**Tableau 9** : Résultats de screening phytochimique de l'extrait *n*-hexane de la résine de pin (ER).

Métabolites secondaires	Observation	Résultats
Flavonoïdes		-
Saponines		-

Quinones libres.		+
Substances phénoliques.		-
Coumarines.		+
Tanins condensés.		-
Protéine.		-
Anthraquinones		-
Sucres réducteurs.		-

(+): indique une présence.

(-): indique une absence.

D'après les résultats obtenus dans le tableau, notre étude montre la présence seulement des quinones libres et des coumarines.

Alors que les flavonoïdes, les saponines, les substances phénoliques, les tanins condensés, les protéines, les anthraquinones et les sucres réducteurs n'étaient pas mis en évidence par le criblage phytochimique.

### I.3. Dosages des polyphénols totaux

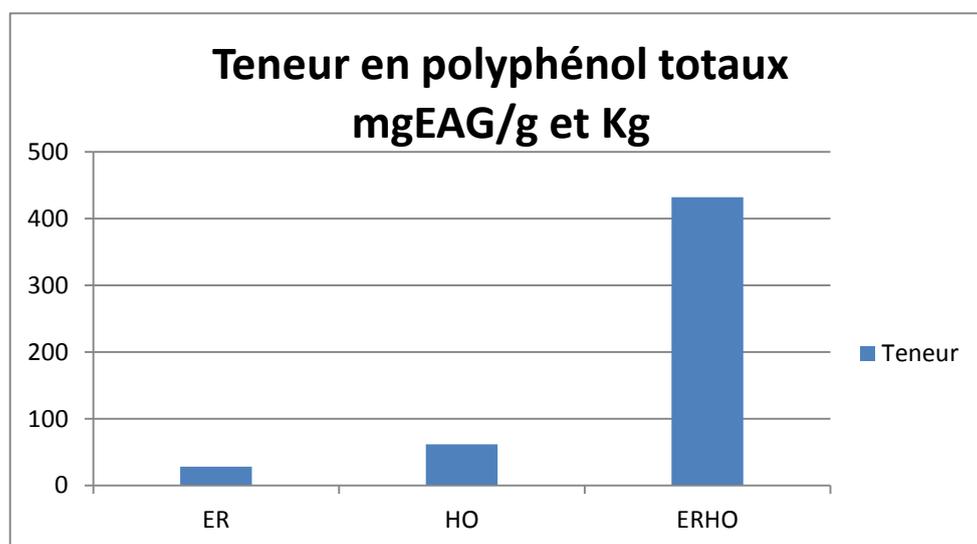
Les composés phénoliques jouent un rôle très important dans la caractérisation et la valeur nutritionnelle des huiles, ils sont aussi les principaux composés responsables de la stabilité des huiles d'olives pendant le stockage et le chauffage (Brenes, 2002).

Les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits étudiés (ER, EPRHO et EPHO) ont été déterminées en utilisant la méthode de FC et exprimées en termes d'équivalents d'un standard à l'aide d'une courbe d'étalonnage, en milligrammes d'équivalent d'acide gallique/g.

Les résultats sont représentés dans le tableau 10 et la figure 21.

**Tableau 10** : teneurs en polyphénol totaux des extraits étudiés

Extrait	Teneur en polyphénols
ER	27.93EAG/g
EPHO	61.73EAG/kg
EPRHO	431.925EAG/kg



**Figure 21** : Teneurs des polyphénols totaux des extraits étudiés.

*ER* : extrait de la résine de pin

*EPRHO* : extrait des polyphénols de la macérât de résine dans l'huile d'olive

*EPHO* : extrait des polyphénols de l'huile d'olive.

Selon la teneur en polyphénols totaux, Tsimidou (1998) a classé l'huile d'olive en :

- Huile d'olive à faibles teneurs en polyphénols totaux (50 - 200 mg/Kg)

- Huile d'olive à teneurs moyennes en polyphénols totaux (200 - 500 mg/Kg)

En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques dans l'huile d'olive tels que (**Evangelisti 1984 ; Ranalli et al., 1999**) :

- la variété de l'olive
- le degré de maturité des olives (la teneur baisse avec la sur-maturation des olives)
- le niveau d'infestation des olives par la mouche *Dacus oleae*
- le climat
- la qualité du sol
- du procédé d'extraction utilisé pour séparer la phase huileuse de la phase aqueuse
- des conditions de conservation de l'huile...

Les résultats de cette étude montre que : d'après le classement de Tsimidou (1998) la teneur en polyphénols totaux de notre huile d'olive est faible 61.73 mg (EAG)/Kg. D'autre coté la teneur en polyphénols de ER est assez faible 27.93 mg (EAG)/g. alors que en note une augmentation significative de la teneur en polyphénols totaux de EPRHO 431.925mg (EAG)/Kg. L'explication de ce résultat nécessite des études approfondie.

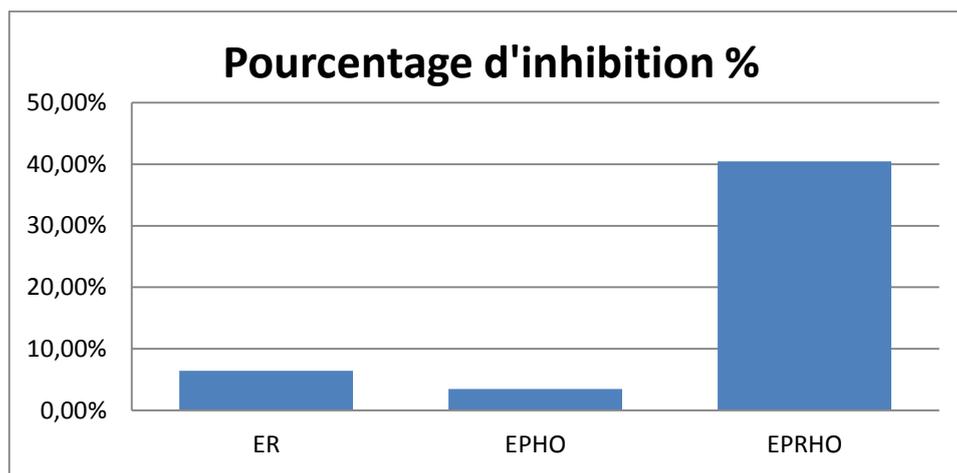
## **II. Activités biologiques**

### **II.1. Evaluation de l'activité antioxydant**

Le DPPH est largement utilisé pour évaluer la capacité des composés antioxydants d'agir en tant que piègeurs de radicaux libres ou donateurs d'hydrogène (**Molyneux, 2004**).

Les effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé dépendent largement à sa teneur en composés phénoliques (**Gimeno et al., 2002**). Ces métabolites secondaires ont la capacité de piéger les radicaux libres.

La figure 17 illustre les résultats de l'activité scavenger du radical DPPH, exprimés en pourcentage (%) d'inhibition, de l'extrait de la résine et les extraits phénoliques des huiles.



**Figure 22** : pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration des extraits testés.

**ER** : extrait de la résine de pin

**EPRHO** : extrait des polyphénols de la macéra de résine dans l'huile d'olive

**EPHO** : extrait des polyphénols d'huile d'olive

Les résultats de cette étude montrent une augmentation significative de l'effet d'inhibition de radical DPPH de EPRHO (40.45%) par rapport à EPHO (3.45%).alors que l'ER montre un pourcentage d'inhibition faible (6.41%). Notant que nous avons réalisé le test de l'ER, en utilisant une concentration importante (5mg/ml), dans les mêmes conditions des extraits polyphénoliques des huiles (EPRHO, EPHO). Ceci peut s'expliquer par les teneurs des polyphénols. En effet, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH en raison de leur structure chimique (**Turkmen et al., 2007**).

## II.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos extraits par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 11. Chaque expérience a été répétée trois fois dans les conditions.

Les souches qui testé sont des bactéries pathogènes lesquels

- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus subtilis*
- *Escherichia Coli*

Tableau 11 : Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne.

Diamètre de la zone d'inhibition (mm) en fonction des différentes concentrations des extraits étudiés (mg/ml).					
	Les souches testées	<b>B.subtilis</b>	<b>S. Aureus</b>	<b>E. coli</b>	
ER	SM	12	14	/	
	D <sub>1</sub>	11	12.75	/	
	D <sub>2</sub>	11	12.25	/	
	D <sub>3</sub>	10	12.25	/	
	Pur	7.5	8.6	/	
	SM	8	9.5	/	
	RHO	D <sub>1</sub>	7.75	8.25	/
		D <sub>2</sub>	7.5	7.75	/
		D <sub>3</sub>	7	6.75	/
		Pur	9	/	/
	HO	SM	7.5	9	/
		D <sub>1</sub>	7	8	/
		D <sub>2</sub>	7	8	/
D <sub>3</sub>		6	0	/	
TM gentamycine	25				

Les résultats du tableau ci-dessus montrent qu'aucun des extraits testés n'a un effet inhibiteur sur l'*Escherichia coli* (Gram positif). Par contre, ils se sont révélés actifs envers les deux autres souches *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram négatif).

En effet. ER a eu une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées. L'effet le plus important est enregistré avec la souche *Bacillus subtilis* avec une zone d'inhibition de 12mm attribués à la concentration mère, alors que la souche *Staphylococcus aureus* montre une activité intermédiaire avec une zone d'inhibition de 14mm.

Cependant, les deux souches (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) montrent une sensibilité vis-à-vis les deux huiles avec des zones d'inhibitions faibles et comparables.

Ces résultats montrent alors que le macérât de la résine dans l'huile d'olive n'a aucune activité antibactérienne envers les bactéries testées.

### II.3. Evaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne de *Fusarium sp* et de *botrytis* sur le milieu PDA en présence de l'extrait testé.

Cette activité a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone de croissance en millimètres, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition.

$$I\% = (C-T)/C \cdot 100.$$

I%= temps d'inhibition en pourcentage %.

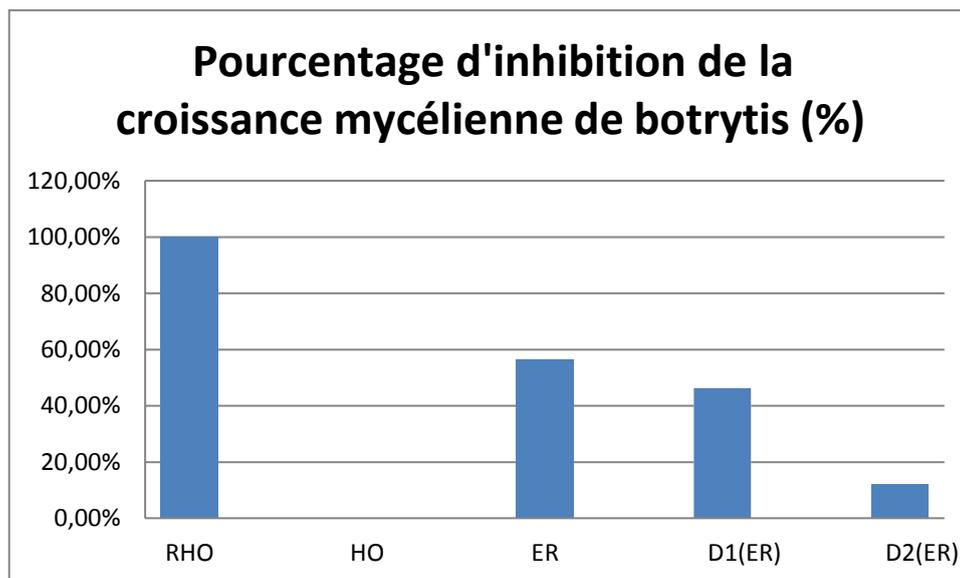
T= croissance radicale de l'agent phytopathogène en mm sur un milieu PDA contenant l'extrait à tester.

C= croissance radicale de l'agent phytopathogène en mm sur milieu PDA (témoin).

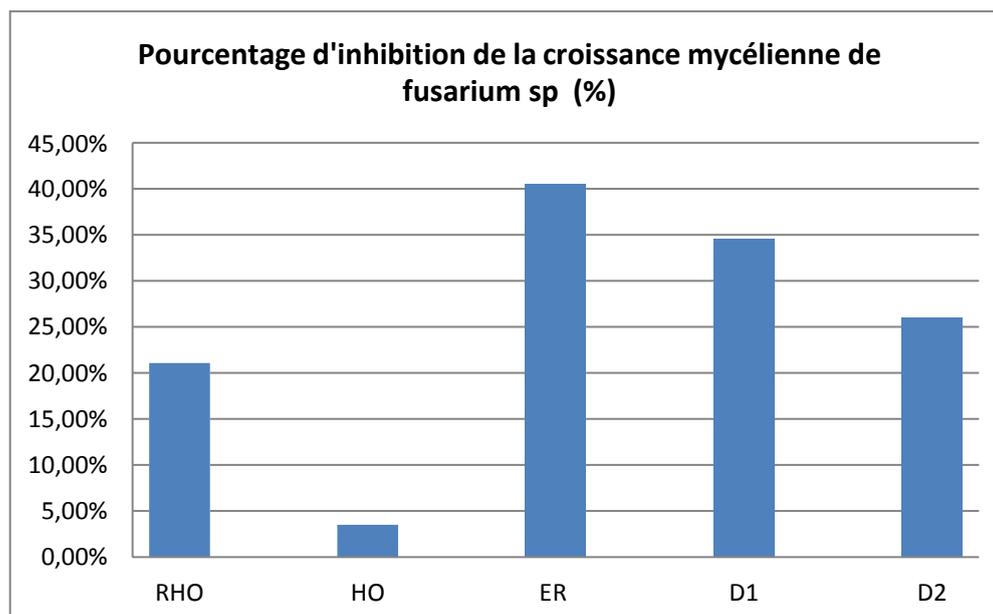
**Tableau 12 :** Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique

Diamètre de la croissance mycélienne (cm) en fonction des différentes concentrations des extraits étudiés (mg/ml).					
Les extraits	RHO	HO	ER		
Concentration.	0.035ml	0.035ml	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml
<i>Botrytis</i>	0	5.24	1.86	2.31	3.775
Témoin (+)	4.3				
Témoin (-)	5.43				
<i>Fusarium sp</i>	3.37	4.12	3.2	3.5	3.97
Témoin (+)	5.35				
Témoin (-)	4.27				

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *botrytis* et *Fusarium sp* est porté dans les figures :



**Figure 23 :** histogramme de pourcentage d'inhibition la croissance mycélienne de *botrytis* en fonction des différents extraits



**Figure 24 :** histogramme de pourcentage d'inhibition la croissance mycélienne de *Fusarium sp* en fonction des différents extraits

**RHO :** Macérât de la résine dans l'huile d'olive

**HO :** Huile d'olive

**ER :** Extrait de la résine

**D :** dilution

Les résultats obtenus ont montré que : HO n'a aucune activité antifongique envers les champignons testés.

Alors que : ER et RHO manifestent une activité antifongique envers les deux champions testés plus ou moins importante.

En effet, RHO, exerce une inhibition totale sur le *botrytis*, cependant vis-à-vis de *Fusarium sp* la réduction de la croissance diamétrale n'est que de 21.07%

ER agit également sur les deux champignons testés, dont, à la concentration maximale, l'inhibition de la croissance diamétrale est respectivement de 56.7% pour *botrytis* et de 40.18% pour *Fusarium sp*. à la concentration de 0.5mg/ml l'inhibition est réduite respectivement à 46.27% pour *botrytis* et à 34.57% pour *Fusarium sp*.. La réduction à la concentration de 0.25mg/ml de la croissance diamétrale n'est que de 12.20% pour *botrytis* et de 25.79% pour *Fusarium sp*.

Ces tests montrent donc que l'utilisation notre recette traditionnelle (macérât de la résine dans l'huile d'olive) possède une bonne activité antifongique notamment contre le champignon *botrytis*.

#### **II.4. Evaluation de l'activité anticoagulante**

L'évaluation de la capacité anticoagulante de nos extraits vis-à-vis de la voie exogène et endogène de la coagulation a été réalisée à l'aide du test de temps de Quik (TQ) et le temps de céphaline-Kaolin (TCK).

Le temps de Quick (TQ) et le temps de céphaline-kaolin (TCK) est réalisé en mettant en présence un plasma citraté (donc anti coagulé par chélation des ions calcium) avec un réactif adéquat (la thromboplastine calcique et le céphaline), lesquels jouent le rôle d'activateur tissulaire de la coagulation. Le plasma coagule et le temps obtenu s'exprime en secondes ou en pourcentage par rapport à un plasma normal utilisé comme témoin, le TQ normal est de 12 à 14s et le TCK normal est de 24 à 41s.

- Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'échantillon exerce un effet anticoagulant vis-à-vis la voie de coagulation exogène.
- Un allongement du TCK en présence des polyphénols par rapport au contrôle indique un effet anticoagulant au niveau de la voie endogène.

##### **II.4.1. Effet de l'extrait de la résine (ER) sur la voie coagulante exogène (TQ) et endogène (TCK)**

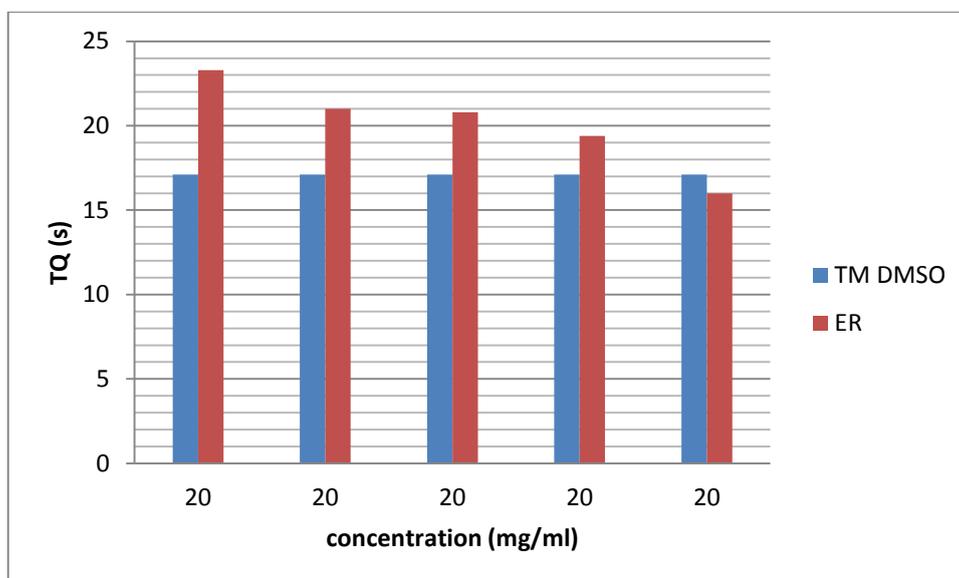
Dans un premier temps, il faut mentionner que l'ajout de l'extrait de la résine au plasma déplaquetés et citraté déclenche immédiatement une précipitation, nécessite une centrifugation

des échantillons pour éliminer ce précipité avant l'ajout des réactifs de coagulations. La quantité de ce précipité est proportionnelle à la concentration de l'extrait.

Les valeurs de temps TQ ont été représentées dans le tableau et la figure ci-dessous :

**Tableau 13** : Résultats de l'activité anticoagulante de la résine.

Teste	TQ					TCK				
Volume (µl)	20 µl									
Concentration	SM	1/2	1/4	1/6	1/8	SM	1/2	1/4	1/6	1/8
ER	23.3	21	20.8	19.4	16	128.6	120.7	96.4	62.4	50
TM DMSO	17.1									

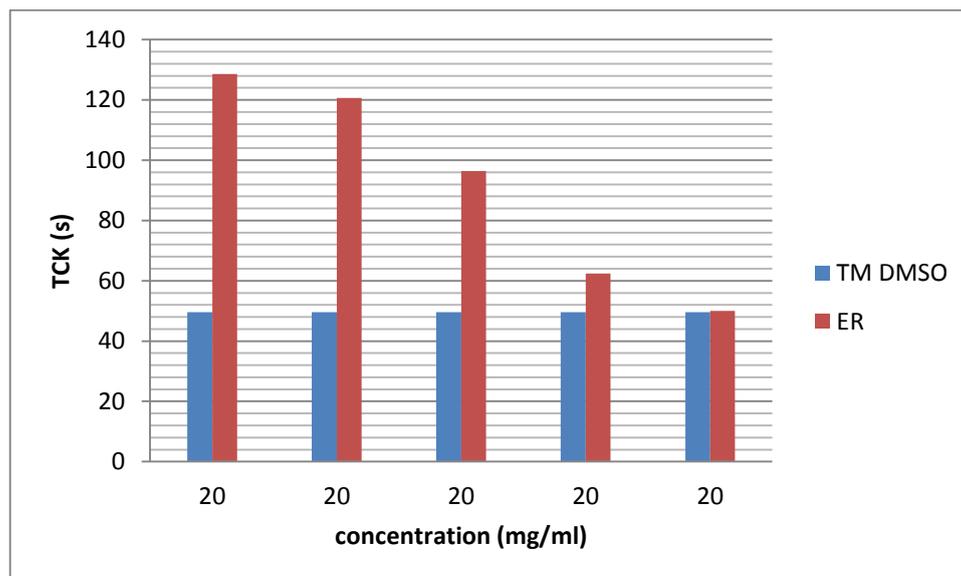


**Figure 25** : Effet de concentration (mg/ml) d'ER avec le plasma sur le TQ (s)

D'après les résultats obtenus, il ressort que le traitement du plasma avec l'extrait de la résine et après l'élimination du précipité formé, capable d'allonger le TQ d'une manière dose dépendante.

On peut supposer que les facteurs de coagulation de la voie exogène diminuent en présence de l'extrait de résine lors de la précipitation, de sorte que nous pouvons conclure que la précipitation n'est que coagulation.

Les valeurs de temps TCK ont été représentées dans la figure ci-dessous :



**Figure 26 :** Effet de concentration (mg/ml) d'ER avec le plasma sur le TCK (s)

**TM :** témoin

**ER :** extrait de la résine

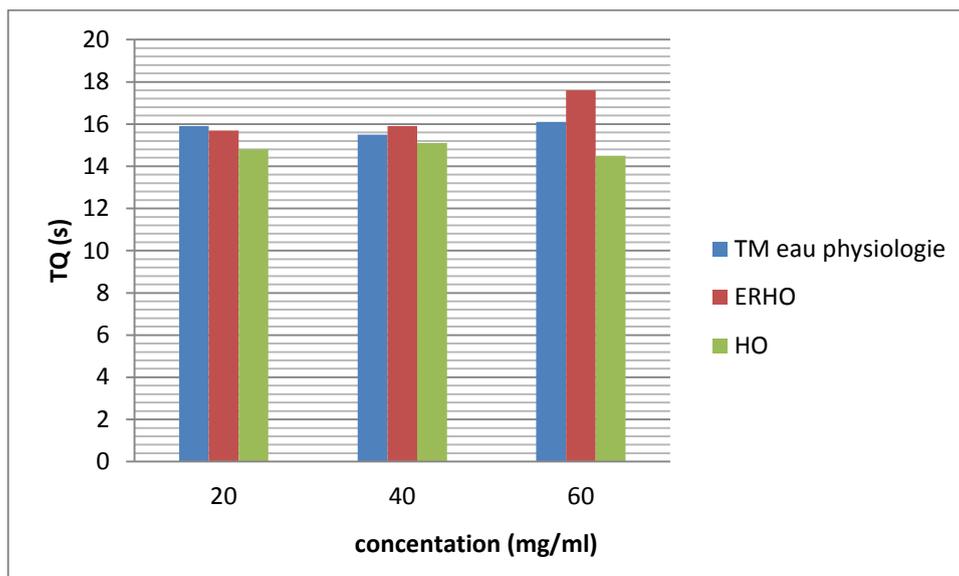
De même, on observe une prolongation du TCK des échantillons testés par rapport à celui du témoin négatif d'une manière dose dépendante. Ce qui Confirme la dégradation des facteurs de coagulation de la voie endogène par l'effet de l'extrait de la résine. Dans l'extrait de la résine a un effet coagulant.

#### II.4.2. Effet de RHO et HO sur la voie coagulante endogène (TCK) et exogène (TQ)

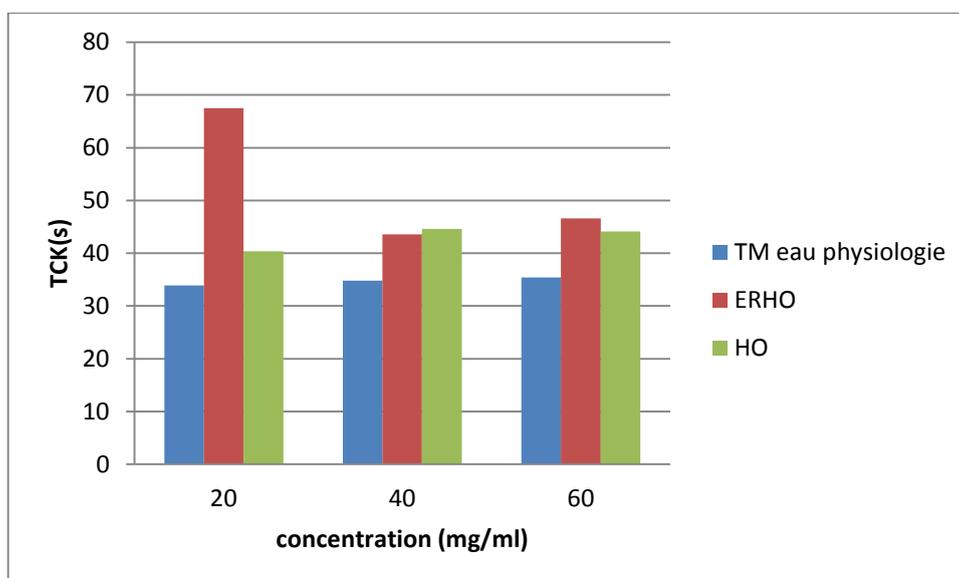
Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 14 :** Résultats de l'activité anticoagulante de RHO et HO.

		Temps de coagulation en (s) des huiles étudiés en fonction des différents volumes					
volume		20		40		60	
Teste		TQ	TCK	TQ	TCK	TQ	TCK
RHO		15.7	67.5	15.9	43.6	17.6	46.6
HO		14.8	40.4	15.1	44.6	14.5	44.1
TM physiologique	eau	15.9	33.9	15.5	34.8	16.1	35.4



**Figure 27 :** Effet de concentration (mg/ml) de RHO et de HO avec le plasma sur le TQ (s)



**Figure 28 :** Effet de concentration (mg/ml) de RHO et de HO avec le plasma sur le TCK (s)

**TM :** témoin

**RHO :** macérât de la résine dans l'huile d'olive.

**HO :** huile d'olive

Les résultats obtenus du TQ et TCK montrent que les huiles RHO et HO n'ont aucun effet sur les voies exogène et endogène de la coagulation par rapport au contrôle négatif.

A la lumière des résultats obtenus, il apparait clairement que le ou les composés de la résine responsable(s) de l'effet coagulant, soit ne sont solubles dans l'huile d'olive ou transfèrent avec des faibles quantités.

# *Conclusion*

La résine de pin est utilisée en médecine traditionnelle algérienne, pour le traitement de maladies respiratoires comme l'asthme, la bronchite, et la toux. Elle est utilisée sous forme de macérât de l'huile d'olive ou bien mélangé avec le miel.

Afin d'évaluer l'efficacité de la résine de pin. Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et biologique de l'extrait de la résine dans le n-hexane et son macérât dans l'huile d'olive.

Le screening phytochimique a été réalisé avec l'extrait de *n*-hexane, montre la présence de coumarines et Quinones libres. Alors que les Flavonoïdes, Saponines, Substances phénoliques, Tanins condensés, Protéine, Anthraquinones, Sucres réducteurs n'étaient pas mis en évidence par le criblage phytochimique.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montre une augmentation significative de la teneur en polyphénols totaux du macérât huileux (431.925mgEAG/kg) par rapport à celle de l'huile d'olive (61.73 mgEAG/kg), alors que l'extrait de *n*-hexane présente une teneur faible en polyphénols (27.93 mgEAG/kg).

De même l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques des huiles révèle une augmentation très importante de pourcentage d'inhibition du radical DPPH du macérât huileux (40.45%) par rapport au celle de l'huile d'olive (3.45%). Notant que, le pourcentage d'inhibition de l'extrait *n*-hexane à une concentration de (5mg/ml) est de l'ordre de (6.41%).

L'activité antimicrobienne de nos extraits, a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque vis-à-vis trois souches bactériennes pathogènes, et deux champignons pathogènes, les résultats montrent une inhibition totale du macérât huileux de la résine sur le botrytis. Tandis que l'extrait *n*-hexane de la résine de pin possède des zones d'inhibitions intermédiaires contre les souches *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* respectivement (14 et 12mm).

L'évaluation de l'activité anticoagulant a été également réalisé *in vitro* en utilisant les tests de temps TQ et TCK. Les résultats obtenus montrent que le macérât huileux de la résine et l'huile d'olive n'ont aucun effet sur les voies exogène et endogène de la coagulation par rapport au contrôle négatif. Alors que l'extrait *n*-hexane de la résine révèle une activité coagulant.

En perspective, Il serait intéressant de compléter la présente étude en développant les points suivants:

- ✓ étudier la stabilité de l'huile issue.
- ✓ Isolement et purification des substances bioactives de la résine de pin.

- ✓ étudier la cytotoxicité.
- ✓ étudié d'autres activités pharmacologiques.

*Références*  
*bibliographies*

**A**

**Agrios, G.N.** Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, USA UK. 2005;

**Ajjan. R., Grant, P. J.** Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*. 2006; 186 : 240–259.

**Alfredsen, G., Solheim, H., & Slimestad, R.** Antifungal effect of bark extracts from some European tree species. *European Journal of Forest Research*. 2008; 127(5), 387–393.

**Amanda L, Clark K.** Effect of unsaturation in fatty acids on the binding and oxidation by myeloperoxidase: Ramifications for the initiation of atherosclerosis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010; 20: 5643–5648.

**ANDO.** Association nationale de la promotion et du développement de la filière oléiculture 2018.

**Antonio, J.** Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles, s.l.: s.n. 1998.

**Aparicio-Ruiz R, Gandul-Rojas B.** Thermal degradation kinetics of neoxanthin, violaxanthin, and antheraxanthin in virgin olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012; 60(20): 5180-5191.

**Argenson C., Régis S., Jourdain J.M.** et Vaysse P., l'olivier. *Ed. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes*. 1999 ; 204 p.

**Athukorala Y., Lee K., Kim S. And Jeon Y.** Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Chime Pharmaceutique*. 2007; 98(9):1711-1716.

**B**

**Bammou m., Daoudi a., Slimani i., Najem m., Bouiamrine e h., Ibijbijen d., Nassiri l.** Valorisation du Lentisque « Pistacia lentiscus L. » : Etude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Applied Biosciences* 2014; 86 :7966-7975. ISSN1997-5902. Meknès.

**Bauters. C.** Athéromatose : un même processus pour différents territoires Artériels. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 2002 ; 51.P: 177–180.

**Belbache, H.** Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de centaurea parvifloradesf, *Mémoire de magister en chimie organique, université Mentouri Constantine*. 2003 ; P 16-20

- Beltrán G, Aguilera MP, Del Rio C, Sanchez S, Martinez L.** Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*. 2005; 89: 207-215
- Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., Bekkar, A. A., Elouissi, M., Khaldi, A., & Hamimed, A.** Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 175, 626-
- Bendif H.** Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques lamiaceae: ajugaiva (L.) Schreb., *teucrium polium* L., *thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et *rosmarinus eriocalyx* Jord. & Fourr. *Thèse de doctorat, Ecole normale supérieure de Kouba-Alger*. 2017 ; 154 p.
- Benrachou N.** Etude des caractéristiques physicochimiques et de la composition biochimique d'huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est algérien. *Thèse de doctorat, Université d'Annaba*. 2013 ; 57-112 p.
- Bentouati A.** Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) Du massif de Ouledyagoub (Khenchla-Aurès). *Thèse Doctorat, Univ. Batna*. 2006 ; p116- 119.
- Bhat, C.R., S. Srinivasan, and K.W. Axhausen.** An Analysis of Multiple Interepisode Durations Using a Unifying Multivariate Hazard Model. *Transportation Research Part B*. 2005; 39(9), 797-823
- Blanche, C.A., Lorio, P.L., Sommers, R.A., Hodges, J.D., Nebeker, T.E.,** Seasonal cambial growth and development of loblolly pine: Xylem formation, inner bark chemistry, resin ducts, and resin flow. *For. Ecol. Manag.* 1992; 49, 151–165. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(92\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0378-1127(92)90167-8) methode de recolte
- Boulkroune H.** L'oléiculture en petite Kabylie : améliorer la qualité du produit participe au développement durable de la filière. *Thèse université Sétif*. 2018; 14p. *huile d'olive*
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995; 28: 25-30.
- Brenes M, Garcia A, Dobarganes MC, Velasco J, Romero C.** Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; **50**: 5962-5967.

**Bruneton J.** Plantes toxiques, Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 3ème édition, *Lavoisier, Paris*. 1996 ; 632 p.

**Bruneton, J.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, *Lavoisier Techniques & Documentation, Paris*. 1999.

**Cowan, M.M.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiolre*. 12 (4): 564- 582.

**Bruyne T., Pieters L., Deelstra H. Etvlietink A.** Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*. 1999 ; 27:445-459.

**O'Connell J.E., Fox P.F.** Signification and applications of phénolic compounds in the production and quality of milk dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 2001; 11(3): 103-120.

**Burton G, Ingold K.** Vitamin E: Application of the principles of physical organic Chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*. 1986 ; 19 pp 194-20

## C

**Chermat, S., &Gharzouli, R.** Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria - An empirical knowledge in djebelzdim (Setif). *Journal of Materials Science and Engineering A*. 2015 ; 5(2), 50–59.

**Cichelli A. And Pertesana G. P.** High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oil: chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*. 2004. 1046:141-146 composition de HO.

**Colvin.B.T.** Physiology of haemostasis.voxsanguinis, 2004; .87(1): 43-46.

**Corti.R.,Hutter.R., Badimon. JJ.,Fuster. V.** Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J thrombositthrombolysis*.. 2004; 17:35–44.

**Cronquist A.,** The Evaluation and Classification of Flowering Plants, *2nd edition Bronx, N. Y USA: The New York Botanical Garden*. 1988.

## D

**Demirci, F., Bayramiç, P., Göger, G., Demirci, B., &Başer, K. H. C.** Characterization and antimicrobial evaluation of the essential oil of Pinuspinea L. From Turkey. *Natural Volatiles & Essential Oils*. 2015 ; 2(2), 39–44.

**Deina, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L.,** Natural product: their chemistry and biological significance. *Journal of the American oilchemistry Society*. 2003 : 80:65-70.

**E**

**Edenharder, R., Grünhage, D.** Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 2003; 540: 1–18.

**Emberger L.,** Traité de Botanique systématique. *Rec. Trav. St. Geol. Zool. Fac. Sci. Montpellier, Ser. Bot.* 1960 ; 47 p

**Eshete, A., Sterck, F.J., Bongers, F.,** 2012. Frankincense production is determined by tree size and tapping frequency and intensity. *For. Ecol. Manag.* 274, 136–142. Gemmage.

**Evangelisti F. Zunin P.** *Dacus olea* infestation and its consequences on the phenolic compounds in virgin olive oil. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* (1984), **71**,507-511.

**G**

**Gandul-Rojas B, Minguez-Mosquera I.** Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *Journal of Science and Food Agriculture.* 1996; 72: 31-39.

**Gausson H.,** *Précis de botanique, tome 2, 2eme édition Paris : Masson.* 1982 ; 579 p.

**Gimeno E, Fito M, lamuealraventos RM, Castellote AI, Cova, M, Farré M, de la Torre-Borant MC, López-Sabater MC.** 2002. Effect of ingestion of virgin olive oil on human low density lipoprotein composition. *European Journal of Clinical Nutrition*, **56**: 114–120.

**Giuffrida D , Salvo F, Salvo A, La Pera L, Dugo G.** Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various Sicilian olive varieties. *Food chemistry.* 2007; 101 (2):833-837.

**H**

**Haslam, E.** (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro.* 59: 205 215

**Havsteen, B.H.** *The biochemistry and medical significance of the flavonoids.* Ph. 2002.

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

**Huang C.L. et Sumpio B.E.** Olive oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health. *America College of Surgeons*, 2008;.207(3): 407-416

**J**

**Jacotot B., Lasserre M., Osteva O., Baudet M.F. et Dachet C.** Corps gras alimentaires et prévention des maladies vasculaires. Etude chez le sujet sain. *Revue Française des Corps Gras*. 1985 ; 85 (2) : 11-16.

**Jacues brosse,**. *Larousse des arbres dictionnaire des arbres et des arbustes, Edition Rustica/FLER, N°de l'editeur ; 48396N1 (F12062). Paris. 2003 ; 325p.* (generalité de le pin).

**K**

**Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Egham, U.K. and Stophes, J.A.** *Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi, 9th edn .CABI. Bioscience.UK. Centre and central Bureau Voie. Utrecht. The Net. 2001.*

**Knudes, H. & Etersen, J. H.,** les champignons dans la nature. *Politiknes svampebog-politikens forlage A/S éd. S.l.:s.n. 2003.*

**KRIEF, S.,** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. *Thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 2003 ; 32p.*

**L**

**Labdaoui D.** Impact socio-économique et environnemental du modèle d'extraction des huiles d'olives à deux phases et possibilité de sa diffusion dans la région de Bouira (Algérie). *Thèse de magistère, université de Mostghanem. 2017 ; 161p*

**Laribi R.** Les composés phénoliques de quelque variété de l'huile d'olive algérienne : identification et propriétés. *Thèse de doctoratenbiochimie. 2015.*

**Liu, Y., Wang, M.W.** Botanical drugs: Challenges and opportunities - Contribution to Linnaeus memorial symposium 2007. *Life Sciences. 2008; 82, 445-449*

**Lopez S, Bermudez B , Montserrat-de la Paz S, Jaramillo S, Varela L, ortegagomez A, Muriana F.** Membrane composition and dynamics: a target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. 2014 ; 1838(6) : 1638-1656.*

**M**

**Manchado P. S. And Cheynier V.** Les polyphénols en agroalimentaire. *Lavoisier, Paris. 2006 ; 398 p.*

**Marc, F., Brisbarre, F., Davin, A., Baccaunaud, M. And Ferrand, C.**Évaluation du pouvoir antioxydant (TEAC) d'extraits de végétaux en vue d'utilisations alimentaires. *An international journal of food science and technology. 2004 ; 24(5):399-414*

**Marouf A and Reynaud J.** La botanique d'a à Z : 1662 définitions. Dunod, Paris. 2007 ; 352p

**Masquelier, J.** Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. 1987; (*Patent No. 4698360*).

**Mir, I. A., Sofi, G., & Mehfooz, S.** Phytochemical Analysis and Pharmacological Studies of pinusroxburghiisarg. *International Archives of Orthopedic Research and Therapy*. 2018 ; 101(01), 1–5

**Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J. Et Lekeux P.** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annal de Médecine Véteronaire*,. 2005 ; 149:1-9.

**Mohammedi Z.** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud-ouest de l'Algérie. *Thèse de doctorat, Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique*. 2013 ; 169p. N

**Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M.** Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*. 1978; 85: 215– 218.

#### N

**Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishna D. R.,** Bioflavonoids Classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indianjournalofpharmacology*. 2001; 33 : 2-16.

**Newman, D.J., Cragg, G.M.** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. 2007; 70, 461-477.

**Nieves Criado M, Paz Romero M, Casanovas M, Motilva M.** Pigment profile and color of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Food Chemistry*. 2008; 110: 873–880.

#### O

**O'fel. A.,** Parasitologie, Mycologie : Maladies parasitaires et fongiques. *Association des professeures de parasitologie*. Paris : E.Crouan et Roques. 1982 ; p.p. 349.

**Osland R.** Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*. 2002 ; 22 : 533-549.

**Owen R.W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B. Et Bartsch H.** Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*. 2003 ; 41:703–717.

**P**

**Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. Et Defraigne J.O.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Physiological action of antioxidant defences. Nutrition et Stress Oxydant. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 2002 ; 16: 233–239.

**Pinelli P., Galardi C., Mulinacci N., Vincieri F.F., Cimato A. Et Romani A.** Minor polar compound and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*. 2003 ; 80: 331–336.

**Pirisi FM, Cabras P, Cao CF, Migliorini M, Magelli M.** Phenolic compounds in virgin oil. 2. Reappraisal of the extraction HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistr.* 2000 ; 48: 1191–1196.

**Pokorny J.** Problème de stabilité des produits alimentaires liés à la présence des lipides. *Lipides et corps gras alimentaires. Paris : Technique et documentation, Lavoisier.* 2003 ; 147-87.

**Q**

**Quentin-Leclerc, J.** Le voyage insolite de la plante au médicament. *Journal De Pharmacie De Belgique*. 2002 ; 57, 11-20.

**R**

**Rebbas, K., Bounar, R., Gharzouli, R., Ramdani, M., Djellouli, Y., & Alatou, D.** Plantes d'intérêt médicinal et écologique dans la région d'Ouanougha (*M'Sila, Algérie*). *Phytotherapie*. 2012 ; 10(2), 131–142.

**Ranalli A, Ferrante ML, demattia G, Costantini N.** Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999 ; 47: 417–424

**Rodríguez-García, A., López, R., Martín, J.A., Pinillos, F., Gil, L.,** Resin yield in *Pinuspinaster* is related to tree dendrometry, stand density and tapping-induced systemic changes in xylem anatomy. *For. Ecol. Manag.* 2014 ; 313, 47–54.

**Rodríguez-García, A., Martín, J.A., López, R., Sanz, A., Gil, L.,** Effect of four tapping methods on anatomical traits and resin yield in Maritime pine (*pinuspinasterait.*). *Ind. Cropsprod.* 86, 2016 ; 143–154.

**Ryan D, Robards K.** Critical Review. Phenolic compounds in olives. *Analyst*. 1998 ; 123(5) : 31R-44R.

**S**

**Samaniego-Sanchez C, Quesada-Granados J, Lopez-Garcia H, De La Serrana M , Lopez-Martinez J.** Beta-Carotene, squalène and waxes determined by chromatographic method in Picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010 ; 23: 671–676.

**Sanchez-Moreno C.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. Of Foods Sci. Tech.* 2002 ; 8: 121-137.

**Scalbert. A.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 1991 ; 30: 3875- 3883.

**Slam-Gaouar M.** Bioécologie de la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* (Gmel) et de sa microflore associée en vue d'une proposition de lutte intégrée. *Mag. En biologie, Université de Tlemcen, Algérie*. 2004.

**Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G.F. et Morozzi G.** Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography*, 2004 ; 1054: 113-127.

**Sidhoum M.** Contribution à l'étude pédologique et génétique de quelques variétés de l'olivier dans la wilaya de Tlemcen. *Mém. Mag. Univ. Tlemcen*. 2011 ; 144 répartition olivier.

**Silbernacl.S., Lang.F.** *Atlas de poche de physiopathologie. Edition: Flammarion. Médecine science*. 2003 ; P :62

**Silverthorn.D.U., William.C.O., Claire.W.G., Andrew.C.S., Bruce.R.J.** *physiologie humaine, 4th edition par pearson Education France*. 2007.

**Simmonds, M.S.J.** Novel drugs from botanical sources. *Drug discovery today*. 2003; 8, 721-722.

**Soltania,** Typologie et Fertilité des stations de pin d'Alep de la forêt de Benjloud (Saida). 2016. P 23.141

**SOUZA, R. O. S., MADEIRA, J. C., CHAGAS, F. D. S., PARREIRAS, L. A., SANTOS, G.R. C., ASSREUY, A. M. S., MOUR~ AO, P. A. S. Et PEREIRA, M. G.,** Purified polysaccharides of *Geoffroea spinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. *Carbohydrate Polymers*, vol. 2015; 124.P:208-215 SURVIE BORÉALE ( en ligne )

**Spigno, G & De Faveri, D.M.** Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*,

2007 ; 78(3), 793-801. Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Food Chem.* 12, 484-496

**Su X., Duan J., Jian Y., Shi J., Kakuda Y.** Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of Oolong tea's. *Food composition Anal.* 2006; 19: 348- 353.

**T**

**Tsagariki E, Harris N, Lazarides B, Konstantionos P.** Olive mill waste water treatment. *Ed. Springer link.* 2007; 133-157.

**Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V.** The contribution of flavonoid C-ring on dpphfree radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food sciemerg Tech*, 2006 ; 7: 140-146.

**Turkmen N., Sedat Velioglu Y., Ferda S & Gokce P.** Effect of Extraction Conditions on Measured. 2007.

**V**

**Vander Pulten, W.H.** *Plant defence belowground and spatiotemporal processes in natural.* 2003.

**Velasco J, Dobarganes C.** Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 2002 ; 104 : 661–676

**Vogler, A.E.,Siedlecki, A.C.** Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials.* 2009.

**W**

**Wojdylo A., Oszmian´ski J., Czemerzys R.** Antioxidant activity and phenolic Compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry.* 2007; 105: 940–949.

**Y**

**Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen,S.S.** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant.Food Hum.Nutr*, 2004; 59:113-122

**Yezza S., et Bouchama S.,** index des métabolites secondaires végétaux, université kasdimerbah, Ouargla faculté des sciences de la nature et de la vie département des sciences biologiques. 2014 ; 47 pages.

**Z**

**Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., shan L., Lin Y., Fan W., Gu G.** Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and Selectivity for free phenolic compounds in barley *Hordeumvulgare* L. *J. Agric. Food Chemistry*, 2006 ; 54: 7277–7286.

**Webographie**

<http://survieboreale.com/wp/>

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.033>

<https://doi.org/10.1007/s10298-012-0701-6>

<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?Docid=US37678335>

<https://doi.org/10.17265/2161-6213/2015.1-2.007>

<https://doi.org/10.1007/s10342-008-0222-x>.

[http://jeanlouis.helardot.free.fr/page\\_pins/generalites.htm](http://jeanlouis.helardot.free.fr/page_pins/generalites.htm)

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.030>

# *Annexes*

## Annexe I : Matériel et réactifs

Verreries et autres	Appareillage	Réactifs et solvants
- bicher	- évaporateur rotatif	- Ethanol
- boîte de pétri	- étuve	- Méthanol
- barreau magnétique	- plaque chauffante	- Hexane
- papier aluminium	-hotte	- Acétone
- Papier filtre	-autoclave	- eau distillé
- tubes avisée	- spectrophotomètre UV-VIS, -	- Hydroxyde d'ammonium
- tubes à essai	agitateur magnétique	- Acide Sulfurique, CuSO <sub>4</sub>
- spatule	- balance analytique	- réactif de Fehling
- erlenmeyers	- balance de précision	- NaOH
- béchers	- Becke benzène,	- anhydride acétique
- entonnoirs	- vortex	- HCl - (Iodure de potassium, Iode: réactif de Wagner)
- pipettes de Pasteur	- bain-marie	- acide gallique
- verre de montre	-	- carbonate de sodium
- pipettes graduées		- réactif de Folin-Ciocalteau –
- éprouvettes		FECl <sub>3</sub>
-micropipettes		- NH <sub>4</sub> OH
		- eau physiologique
		- Milieu Muller-Hinton
		- Milieu Gélose nutritive
		- DPPH.
		- Agar
		- DMSO

## Annexe II: dosage des polyphénols

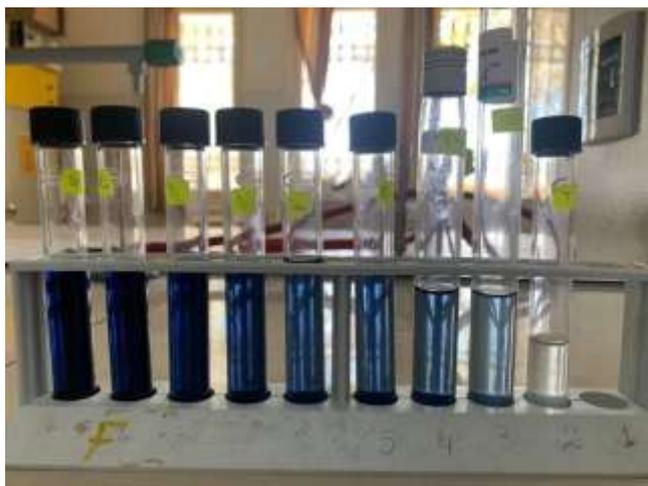


Figure 1 : préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique.

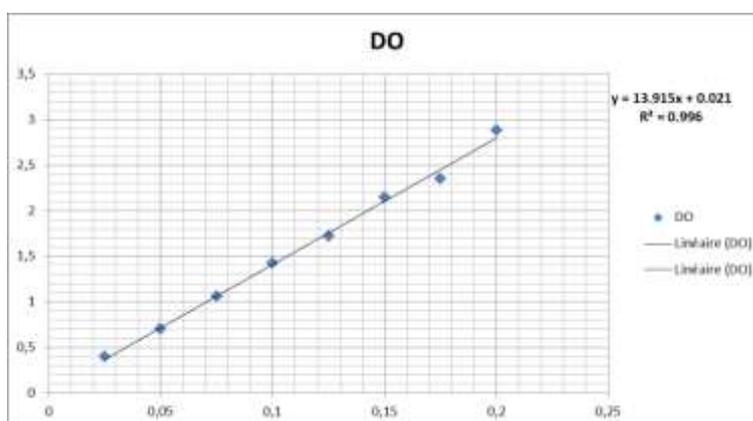


Figure 2 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour l'évaluation des teneurs en polyphénols.

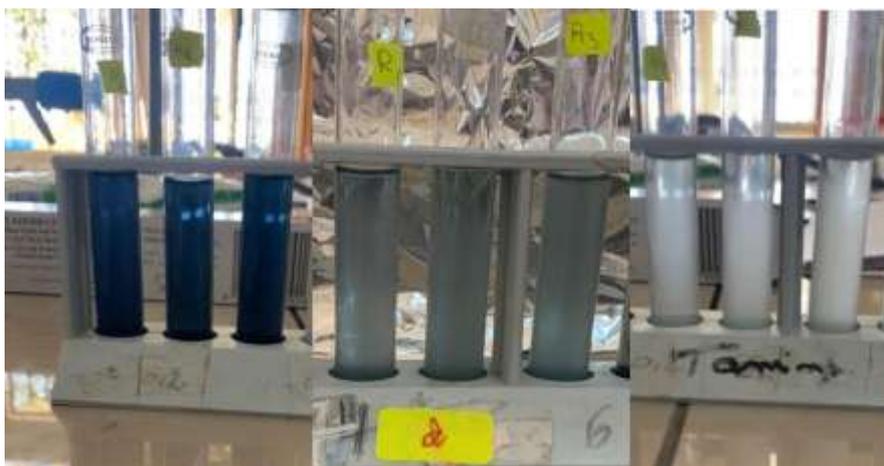


Figure 3 : dosage de polyphénols totaux des trois extraits (photo personnelle 2023)

Annexe III : évaluation de l'activité antibactérienne

Tableau 1 : résultats de l'activité antibactérienne

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER			
RHO			
HO			

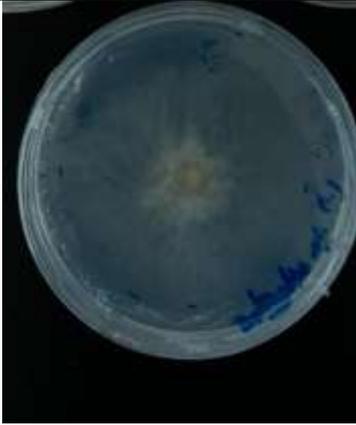
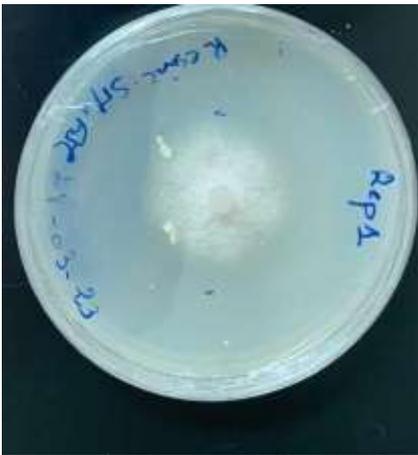
## Annexe IV : évaluation de l'activité antifongique



Figure 5 : Différentes étapes de préparation de milieu PDA

Tableau 2 : résultats de l'activité antifongique

<i>Extrait</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>botrytis</i>
témoin positif		

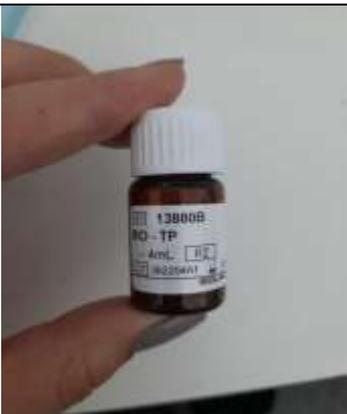
<p>Témoins négatif</p>		
<p>ER (SM)</p>		
<p>ER (D1)</p>		



## Annexe V : évaluation de l'activité anticoagulante

Tableau 3 : les étapes de l'activité anticoagulante

Les étapes de l'activité anticoagulante	
Prélèvement	
centrifugation	
Séparation de plasma	
Préparation des échantillons	

<p><b>Réactif de TQ</b></p>	
<p><b>Réactif de TCK</b></p>	
<p><b>Lecture des résultats</b></p>	