

République Algérienne Démocratique Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة ابن خلدون - تيارت
Université Ibn Khaldoun – Tiaret



Faculté des Sciences de la Matière
كلية علوم المادة
Département de Chimie
قسم الكيمياء

Mémoire
Présenté par :
M^{elle}. MOSTFAI SOUAD

Pour obtenir le diplôme de
Master
Filière : Chimie
Spécialité: Chimie Organique
Diplôme de Projet Startup
Sujet :

**Etude phytochimiques, activités biologiques
et formulation d'un film actif a base des extraits
d'une gomme naturelle**

Soutenu le : 30/06/2024

Devant le jury:

M ^{me} ABDELMALEK Ilham	Présidente	MCA à	Univ Tiaret
M ^{me} . H. MABREK	Examinatrice	MAA à	Univ Tiaret
M ^{lle} . L.BENNABI	Examinatrice	MCA à	Univ Ain Timouchent
M ^{lle} . M.HENNI	Promotrice	MCA à	Univ Tiaret
M ^f T.Moumene	Représentant de l'incubateur	MCA à	Univ Tiaret
M ^{me} H.Sofiane	Ingénieur	Chef de station de surveillance de Tiaret	

Année universitaire : 2023/2024

اهداء

بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ
الرَّحِيمِ

" يرفع الله الذين امنوا منكم والذين اوتوا العلم درجات "

" صدق الله العظيم "

الحمد لله الذي أنشئ وبرى وخلق الماء والثرى وأبدع كل شيء وذرى الحمد لله الذي وفقنا الى
هذا وما كنا بفضلله لمن الواصلين

اهدي هذا النجاح لنفسي أولاً ثم الى كل من سعى معي لإتمام هذه المسيرة دتمم لي سندا
الى من كلله الله بالهبة والوقار الى من ساندني بكل حب الى من احمل اسمه بكل افتخار
والذي العزيز اطال الله في عمره

الى من جعل الله الجنة تحت اقدامها الى من كان دعاؤها سر نجاحي امي الغالية اطال الله
في عمرها

الى رمز الطيبة والحنان وبركة الحياة كانت في وجودك جدتي فقيدتي رحمك الله في قلب
حفيدتك لم تموتي

الى من ساندوني عند ضعفي وساقوني بالحب الى من رسموا لي مستقبل بخطوط من
الثقة (عماتي فاطمة وعدلة واعمامي عبد القادر ومجد)

الى من شد الله بهم عضدي فكانوا خير معين (ايمان عماد رشل)

الى من يحسنون الصحبة ويكرمون الرفقة فلا يشقى في صحبتهم أحد صديقات الطفولة
(أحلام سميرة)

الى رفيقات القلب التي جمعتني بهن الجامعة اولهن (هيام ايمان فاطمة اكرام

زينب)

ولله الشكر انه وفقني لهذه اللحظة، لم تكن الأمور يسره ولكن بحول الله قد وصلت لهذا
فالحمد لله ربي العالمين.

الخريجة سعاد



Remerciements

Le grande merci s'adresse au bon DIEU, le tout Puissant, qui ma donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

*J'exprime mes profondes gratitudees et reconnaissances à mon encadreur **M^{elle} Henni Meriem** maitre de conférences A, à l'université de Tiaret, pour avoir proposé et accepter de diriger, avec beaucoup de patience, ce sujet de mémoire de Master et je ne peux pas jamais oublier ses encouragements et ses conseils.*

*J'exprime mes remerciements à **M^{me} Abdel Malek Ilhem** maitre de conférences A à l'université de Tiaret, pour avoir accepté de présider ce jury.*

*J'exprime mes remerciements à **M^{me} Mebrak horia** maitre assistant A à l'université de Tiaret, D'avoir accepter d'examiner ce travail.*

*Mes vifs remerciements vont à **M^{elle} Bennabi Lamia** maitre de conférences A à l'université d'Ain Timouchent d'avoir accepter de juger ce travail*

*Mes remerciements sont destinés aussi envers
Mr Moumene Taqiyeddine*

M^{me} sofiane hamida

Qui nous fais l'honneur de présider ce jury afin d'évaluer ce projet d' étude qui rentre dans le décret 1275 des Startup

*Je tiens aussi à remercier **Mr Yesref Djamel**, chef du département de chimie pour son aide précieuse*

*J'exprime mes remerciements à toute l'équipe de laboratoire de synthèse et catalyse et plus notamment: **Mr Belarbi El Habib** et **M^{me} Nadia***

*Je tiens à exprime mes profondes reconnaissances a toute l'équipe de laboratoire de graduation de chimie et plus notamment Monsieur **Larbi** ainsi que **M^{me} Somia** et **M^{me} Fatifa**.*

*J'adresse mes remerciements à tous les ingénieurs de laboratoires de biochimie de Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie notamment **M^{me} Fatima** et **M^{elle} Mebarqa**, pour leurs aides à réaliser ce travail*



Liste d'Abréviations

<i>B. Cereus</i>	<i>Bacillus Cereus</i>
<i>BS</i>	<i>Bacillus subtilisé</i>
<i>ECT</i>	<i>Equivalente de catéchine</i>
<i>CPT_s</i>	<i>Teneur des polyphénols totaux</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxyde</i>
<i>DPPH</i>	<i>2, 2-diphényle-1-picrylhydrazyl</i>
<i>EAG</i>	<i>Equivalente acide gallique</i>
<i>EAT</i>	<i>Equivalent acide tannique</i>
<i>EC</i>	<i>Extraction chloroforme</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
<i>ECT</i>	<i>Equivalente de catéchine</i>
<i>EQ</i>	<i>Equivalents de quercétine</i>
<i>GN</i>	<i>Gélose nutritive</i>
<i>IR</i>	<i>Infra rouge</i>
<i>MH</i>	<i>Mueller Hinton</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>UFC</i>	<i>Unité Faisant colonie</i>
<i>UV</i>	<i>Ultraviolet</i>

Liste des figures

Partie théorique

Chapitre I Généralité sur le polyphénol

<i>Figure I.1 : Les différentes classes des composés phénoliques</i>	3
<i>Figure I.2 : Structure de base des flavonoïdes</i>	4
<i>Figure I.3 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes</i>	5
<i>Figure I.4 : Structure de base des coumarines</i>	6
<i>Figure I.5 : Structures de base des Tanins condensés</i>	7

Chapitre II Généralité sur le Pin d'Alep

<i>Figure II.1 : Description morphologique du pin d'Alep</i>	12
<i>Figure II.2 : Aire de répartition du Pin d'Alep dans le monde</i>	13
<i>Figure II.3 : Méthode de gemmage traditionnelle</i>	15
<i>Figure II.4 : Méthode de gemmage en vase clos</i>	15
<i>Figure II.5: Libération progressive de biocide par l'emballage bioactif</i>	17

Partie expérimentale

Chapitre I Matériels et Méthodes

<i>Figure I.1 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH</i>	25
<i>Figure I.2: Repiquage des souches bactériennes</i>	27
<i>Figure I.3 : Préparation de l'inoculum</i>	27

Chapitre II Résultat et discussion

<i>Figure II.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique</i>	34
<i>Figure II.2 : Courbe d'étalonnage de quercitrine</i>	35
<i>Figure II.3 : Courbe d'étalonnage de catéchine</i>	35
<i>Figure II.4: Teneur en des composés phénoliques des extraits chloroformiques</i>	36
<i>Figure II.5: Activité de piégeage du radical libre DPPH des extraits</i>	36
<i>Figure II.6 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis Bacillus Cereus</i>	37
<i>Figure II.7 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis B. Cereus</i>	38
<i>Figure II.8 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis vis Escherichia coli</i>	38
<i>Figure II.9 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis vis S. aureus</i>	38
<i>Figure II.10 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis vis Bacillus Cereus</i>	39
<i>Figure II.11: Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des extraits</i>	39
<i>Figure II.12 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis Staphylococcus aureus...</i>	40

Figure II.13 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis Escherichia coli..... 40

Figure II.14 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis Bacillus Cereus 40

Liste des tableaux

Partie théorique

Chapitre II Généralité sur le Pin d'Alep

<i>Tableau II.1: Position taxonomique de Pin d'Alep</i>	<i>12</i>
---------------------------------------------------------------	-----------

Partie expérimentale

Chapitre I Matériels et Méthodes

<i>Tableau I.1 : Préparation des dilutions d'acide gallique.....</i>	<i>21</i>
----------------------------------------------------------------------	-----------

<i>Tableau I.2: Préparation des dilutions de la quercitrine.....</i>	<i>22</i>
----------------------------------------------------------------------	-----------

<i>Tableau I.3 : Préparation des dilutions de la catéchine</i>	<i>23</i>
----------------------------------------------------------------------	-----------

<i>Tableau I.4 : Les souches bactériennes utilisées</i>	<i>26</i>
---------------------------------------------------------------	-----------

Chapitre II Résultat et discussion

<i>Tableau II.1: Les caractéristiques des extraits chloroformiques.....</i>	<i>32</i>
-----------------------------------------------------------------------------	-----------

<i>Tableau II.2: Résultats du criblage phytochimique des extraits</i>	<i>33</i>
-----------------------------------------------------------------------------	-----------

<i>Tableau II.3: Principales bandes d'absorption infrarouge des films</i>	<i>41</i>
---------------------------------------------------------------------------------	-----------

Sommaire

<i>Introduction générale</i>	1
Partie théorique	
Chapitre I Généralités sur les polyphénols	
<i>I. Généralités sur les polyphénols</i>	2
<i>I.2 Définition</i>	2
<i>I.3 Classification des polyphénols</i>	2
<i>I.3.1 Acides phénoliques</i>	3
<i>I.3.2 Les Flavonoïdes</i>	4
<i>I.3.3 Les coumarines</i>	6
<i>I.3.4 Les alcaloïdes</i>	6
<i>I.3.5 Tanins</i>	6
<i>I.4 Biosynthèse des composés phénoliques</i>	7
<i>I.4.1. La voie de l'acide shikimique</i>	8
<i>I.4.2 La voie d'acétate / malonate</i>	8
<i>I.4.5 . Activité biologique des polyphénols</i>	8
<i>I.5.1 Activité antioxydant</i>	8
<i>I.5.2 Activité antimicrobienne</i>	8
<i>I.5.3 Activité anti-inflammatoire</i>	9
<i>I.6 Méthodes d'extraction des polyphénols</i>	9
<i>I.6.1 Méthodes classiques d'extraction</i>	9
<i>I.6.2 Méthodes moderne d'extraction</i>	10
<i>I.6.2.1 Extraction par ultrasons (EAU)</i>	10
<i>I.6.2.2Extraction assistée par micro-ondes (EAM)</i>	10
<i>I.6.2.3 Extraction par fluides supercritiques (EFS)</i>	10
Chapitre II Généralité sur le Pin d'Alep	
<i>I.1 Généralité</i>	11
<i>I.2 Description botanique</i>	11
<i>I. 3 Classification</i>	12
<i>I.4 Répartition géographique de pin d'Alep</i>	13
<i>I.4.1 Dans le monde</i>	13
<i>I.4.2 En Algérie</i>	13

<i>I.5 Résine de Pinus halepensis</i>	14
<i>I.5.1 Définition</i>	14
<i>I.5.2 Composition chimique</i>	14
<i>I.5.3 Caractéristiques</i>	14
<i>I.5.4 Récolte de la résine</i>	14
<i>I.5.4.1 Méthode traditionnelle</i>	15
<i>I.5.4.2 Méthode moderne</i>	15
<i>I.5.5 Utilisation de la résine</i>	15
<i>I.6 Emballage bioactif</i>	16
<i>I.6.1 Agents bioactifs</i>	16
<i>I.6.2 Rôle d'emballage bioactif</i>	16
<i>I.6.3 Utilisation des films bioactifs dans l'industrie alimentaire</i>	17

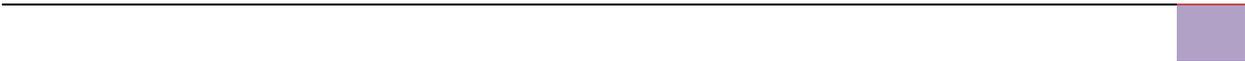
Partie expérimentale

Chapitre I Matériels et méthodes

<i>I.1 Introduction</i>	18
<i>I.2 Préparation de matériel végétal</i>	18
<i>I.2.1. Séchage de la résine</i>	18
<i>I.2.2. Broyage</i>	18
<i>I.2.3. Tamisage</i>	18
<i>I.3Extraction des polyphénols par reflux</i>	18
<i>I.3.1 Mode opératoire</i>	18
<i>I.3.2 Conservation de l'extrait</i>	19
<i>I.3.3 Rendements des extractions</i>	19
<i>I.4 Analyse qualitatif</i>	19
<i>I.4.1 Analyse des extraits par infrarouge IR</i>	19
<i>I.5 Analyse chimique</i>	19
<i>I.5.1 Criblage phytochimique</i>	19
<i>I.6 Analyses quantitatives des extraits</i>	21
<i>.6.1 Dosage des phénols totaux</i>	21
<i>I.6.2 Dosage des flavonoïdes totaux</i>	22
<i>I.6.3 Dosage de tanins condensés</i>	23
<i>I.7 Détermination de l'activité antioxydant</i>	24
<i>I.7.1 Principe</i>	24

<i>I.7.2 Préparation de la solution mère de DPPH</i>	25
<i>I.7.3 Préparation des dilutions d'extraits</i>	25
<i>I.7.4 Mode opératoire</i>	25
<i>I.8 Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits</i>	25
<i>I.8.1 Matériel Biologique</i>	25
<i>I.8.2 Repiquage des souches bactériennes</i>	26
<i>I.8.3 Préparation de suspension bactérienne</i>	27
<i>I.8.4 Ensemencement</i>	28
<i>I.8.5 Méthode de diffusion des puits</i>	28
<i>I.8.5.1 Premier protocole</i>	28
<i>I.8.5.1 Deuxième protocole</i>	28
<i>I.8.5.1 Troisième protocole</i>	29
<i>I.8.6 Méthode de diffusion sur disque</i>	29
<i>II.1 Préparation des films</i>	29
<i>II.2 Caractérisation des films</i>	29
<i>II.2.1 Humidité</i>	29
<i>II.2.2 La solubilité dans l'eau</i>	30
<i>II.2.2.1 Mode opératoire</i>	30
<i>II.3 Activité antioxydant d'un les films</i>	30
<i>II.4 Activité antibactérienne</i>	31
Chapitre II Résultats et discussion	
<i>I.1 Rendement des extraits</i>	32
<i>I.2. Caractérisation des extraits par spectroscopie infrarouge</i>	32
<i>I.3 Résultats de criblage phytochimiques</i>	33
<i>I.4 Analyse quantitative</i>	34
<i>I.4.1 Dosage des polyphénols totaux</i>	34
<i>I.4.2 Dosage des flavonoïdes</i>	34
<i>I.4.3 Teneur en tannins condensés</i>	35
<i>I.5 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits</i>	36
<i>I.6 Pouvoir antibactérien des extraits</i>	37
<i>II.6.1 Test de diffusion sur disque</i>	37
<i>I.7 Méthode de diffusion des puits</i>	37
<i>I.7.1. Première protocole</i>	37

<i>I.7.2 Deuxième protocole</i>	38
<i>I.7.3 Troisième protocole</i>	39
<i>II.1 Caractérisation du film</i>	41
<i>II.1.1 Caractérisation par spectroscopie d'absorption infrarouge</i>	41
<i>II.1.2 Humidité</i>	41
<i>II.1.3 La solubilité</i>	41
<i>II.2 Activité antioxydant</i>	42
<i>II.3 Activité antibactérienne du film</i>	42
<i>Conclusion générale</i>	43



Introduction générale

Introduction générale

Actuellement, dans le domaine de l'emballage alimentaire, il existe un grand intérêt pour le développement de matériaux actifs biodégradables, qui contribuent à la fois à une réduction de l'utilisation de déchets plastiques synthétiques et à une durée de conservation plus longue des produits alimentaires grâce à l'incorporation de substances actives, telles que des antioxydants et des antimicrobiens. Parmi les polymères biodégradables, les polysaccharides comme l'amidon ou le chitosane ont une bonne capacité filmogène [1]. Les films d'amidon (S) sont peu coûteux, flexibles, transparents et hautement imperméables à l'oxygène, mais présentent un degré élevé de sensibilité à l'eau qui affecte négativement les propriétés barrières et mécaniques[2]. Les polysaccharides sont des matériaux biodégradables que l'on trouve en abondance dans la nature. Il existe différents types de polysaccharides provenant de différentes sources naturelles. Les polysaccharides typiques utilisés dans l'alimentation et d'autres industries comprennent la cellulose, l'amidon, le chitosane et la chitine, les gommes de caroube et de tara, le xanthane, l'agar, les pectines, les algines/alginate, les gellanes [3-5]. Ces polysaccharides ont été développés en films et revêtements pour l'emballage de différents produits alimentaires. Une stratégie consiste à ajouter des composés bioactifs tels que des polyphénols ou des extraits riches en polyphénols pour formuler des films et des revêtements multi-fonctionnels[6,7]. Récemment, les films comestibles fabriqués par les gommes naturelles pourraient être une alternative prometteuse, car elles sont biocompatibles, peu coûteuses, non toxiques et facilement disponibles [8,9]. Notre travail visant à développer un film actif à base des biopolymères (amidon/gomme de pin d'alpe) suivi d'une caractérisation.

Le présent manuscrit comprend deux parties :

- Partie bibliographique de ce mémoire est consacrée à une synthèse bibliographique sur les composés phénoliques, leur classification leur Biosynthèse, leur activité biologique, les Méthodes d'extraction des polyphénols, une généralité sur le Pin d'Alpe, la répartition géographique, la gomme et sa composition chimique
- La partie expérimentale dans laquelle nous abordons les méthodes utilisées pour l'extraction des composés phénoliques, les tests photochimiques et le dosage des polyphénols, suivie par la formulation d'un film actif à base d'amidon/ polyphénols ensuite des essais de solubilité, humidité ont été réalisés. Cette partie a été complétée Par une évaluation, de l'activité antioxydante et activité antibactérienne du film élaboré vis-à-vis des souches sélectionnées, à la fin une conclusion générale.

Partie théorique

Chapitre I Généralité sur les polyphénols

1.1 Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols sont des composés naturels que l'on trouve en grande partie dans les fruits, les légumes, les céréales et les boissons. Les fruits comme les raisins, les pommes, les poires, les cerises et les baies contiennent jusqu'à 200 à 300 mg de polyphénols pour 100 grammes de poids frais. Les produits fabriqués à partir de ces fruits contiennent également des polyphénols en quantités importantes. Les céréales, les légumineuses sèches et le chocolat contribuent également à l'apport polyphénolique[10,11]. Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes et sont généralement impliqués dans la défense contre les rayons ultraviolets ou contre l'agression d'agents pathogènes.³ Dans les aliments, les polyphénols peuvent contribuer à l'amertume, à l'astringence, à la couleur, à la saveur, à l'odeur et à la stabilité oxydative. Vers la fin du 20^{ème} siècle, des études épidémiologiques et des méta-analyses associées suggéraient fortement que la consommation à long terme d'alimentations riches en polyphénols végétaux offrait une certaine protection contre le développement de cancers, de maladies cardiovasculaires, de diabète, d'ostéoporose et de maladies neurodégénératives [12,13].

1.2 Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure [14].

1.3 Classification des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent-être répartis selon, la complexité de leur squelette de base, le degré de modification de ce squelette et les liaisons possibles de ces composés avec d'autres molécules, en une dizaine de classes différentes [15,16]. Ils ont pour structure de base, plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils vont de la simple structure avec un anneau aromatique à des substances polymériques hautement complexes tels que les tanins et les lignines. Les phénols sont des constituants importants de certaines plantes médicinales et sont utilisés dans l'industrie alimentaire.

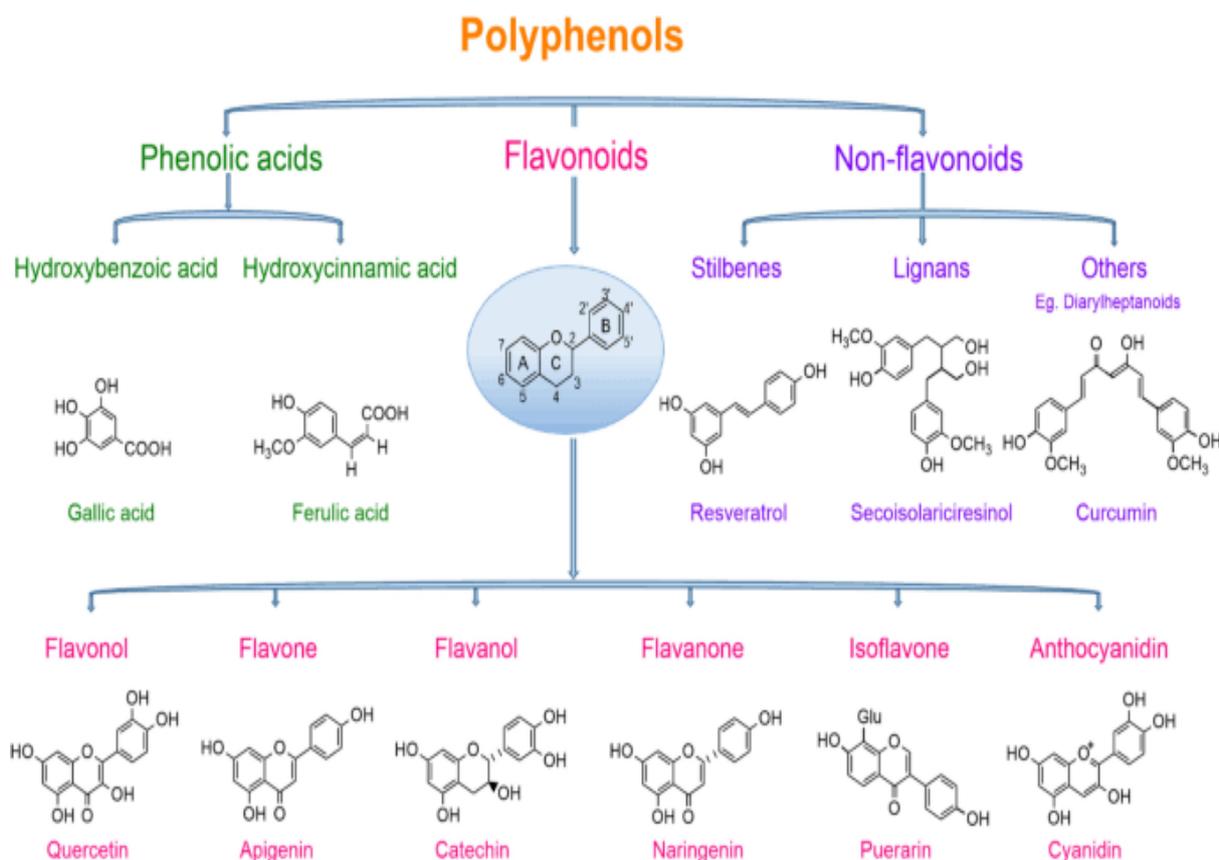


Figure I.1 : Les différentes classes des composés phénoliques.

I.3.1 Acides phénoliques

Les acides phénoliques, ou acides phénols ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature [17]. Ils se divisent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) [18].

a) Acides hydrox benzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïques et ont une formule de base de type C₆-C₁. Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides, [19]. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides phydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique [20].

b) Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydrox cinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C₆-C₃ dérive de celle de l'acide cinnamique). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des

éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes [21].

1.3.2 Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils interviennent aussi dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [22]. Ils ont un squelette de base de quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration $C_6-C_3-C_6$, constitués de 2 cycles aromatiques A et B reliés par une chaîne en C_3 qui forme un hétérocycle oxygéné C [23]. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils ont des rôles variés dans les plantes en tant que métabolites secondaires, étant impliqués dans les processus de défense contre les UV, la pigmentation, la stimulation des nodules de fixation de l'azote et la résistance aux maladies [24]

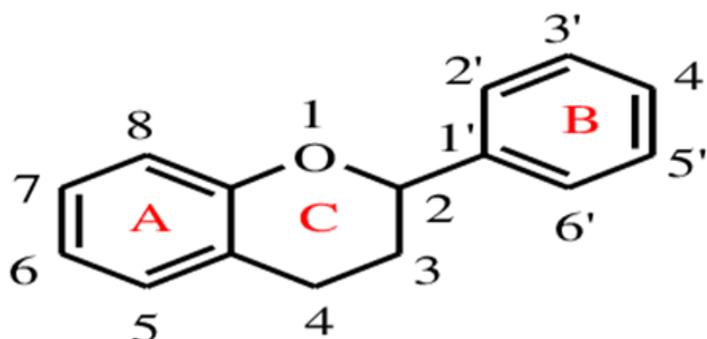


Figure I.2 : Structure de base des flavonoïdes

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones, les anthocyanidines, les chalcones et les aurones.

- **Les flavonols**

Les flavonols se caractérisent par un hétérocycle oxygéné relativement oxydé. Ils existent sous des formes glycosylées (glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose) [25].

Ce sont des flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le Kaempférol et la quercétine [26].

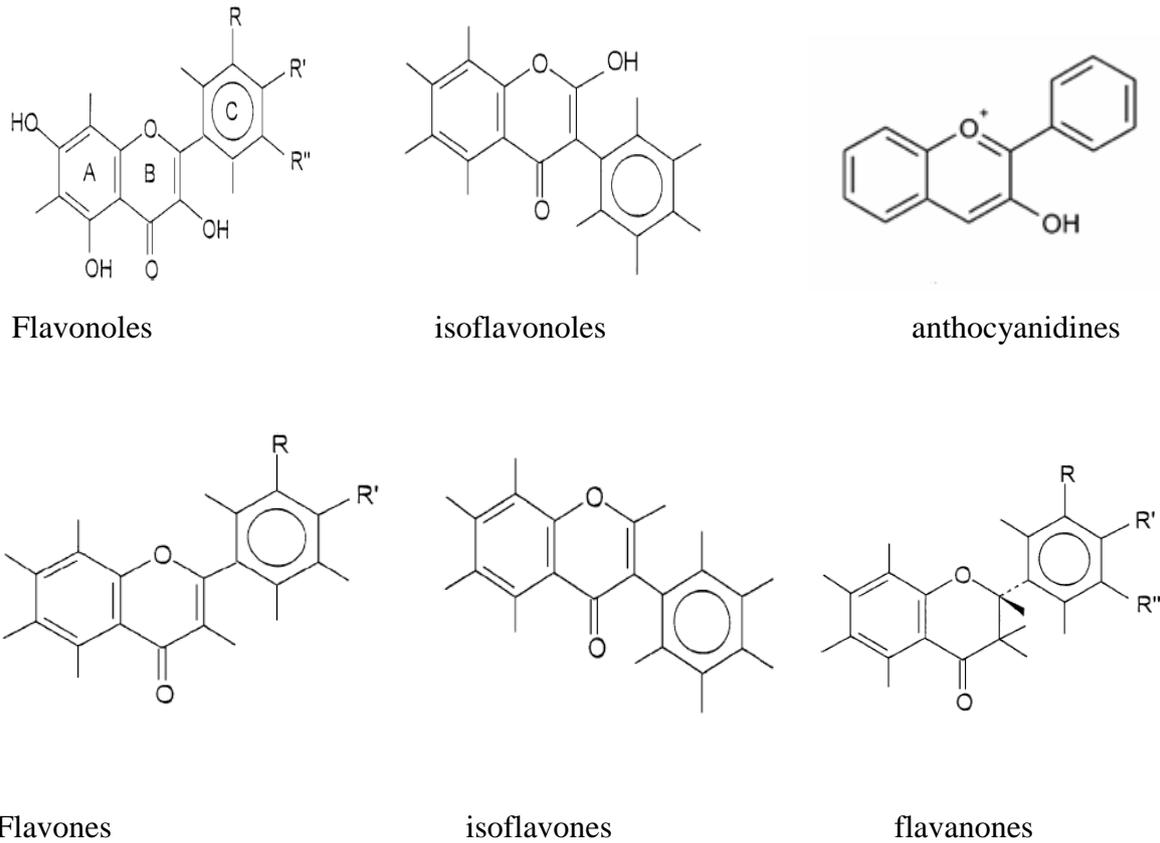


Figure I.3 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes

- **Les flavones**

De tous les flavonoïdes, cette sous-classe est la moins abondante dans les fruits et légumes. Ils sont essentiellement constitués de lutéoline et apigénine glycosylés. Les seules denrées comestibles connues à ce jour qui en possèdent sont le persil et le céleri[26].

- **Les flavanones**

Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents des quantités importantes dans le citron. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron. La position 7 est le siège de la glycosylation [26].

- **Les isoflavones**

Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, qui peuvent être glycosylés ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses[26].

- **Les flavanols**

Les flavanols existent sous forme de monomères, dont l'unité la plus simple est la catéchine, et sous forme polymérique appelés les proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de

nombreux fruits comme la pomme, mais le chocolat et le thé sont les principales sources de ce composé [26].

- **Les anthocyanes**

Les anthocyanes sont des pigments naturels colorés que l'on retrouve dans les plantes vasculaires. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Une caractéristique importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques peuvent en témoigner[26].

1.3.3 Les coumarines

La famille des coumarines est formée des composés phénoliques dérivés de la coumarine simple, la 2H-1-benzopyrane-2-one, molécule elle-même dénuée de groupe hydroxyle phénolique OH. Toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle phénolique [27] Elles se trouvent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau[28].

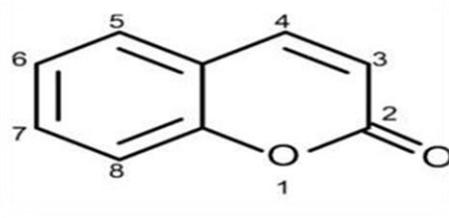


Figure I.4 : Structure de base des coumarines

1.3.4 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées, le plus souvent, d'origine végétale, pour la plupart de série cyclique, basique, donnant des réactions de précipitation avec certains réactifs appelés "réactifs généraux des alcaloïdes" et données à faibles doses, des propriétés physiologiques et pharmacodynamiques marquées [29,30]

1.3.5 Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Très répandu dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés [31].

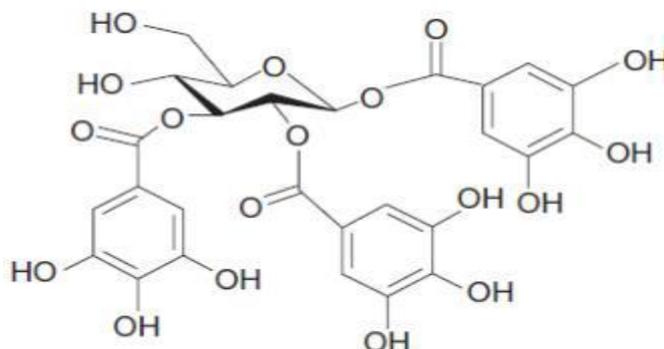


Figure I.5 : Structures de base des Tanins condensés

a) Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables ou acides tanniques sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation ; l'acide gallique. Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Ils peuvent diminuer la dégradation des parois dans le rumen et être hydrolysés dans l'intestin en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein [32]. Ils sont divisés en ellagitannins et gallotannins, Les gallotannins libèrent par hydrolyse acide, hydrolyse basique, à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique [33].

b) Tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines. Les tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C₄-C₆) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C₂ et C₇, les proanthocyanidines sont dits de types A [34].

I.4 Biosynthèse des composés phénoliques

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la formation de la plupart des composés phénoliques chez les végétaux [35]. Ces composés sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate [36].

1.4.1. La voie de l'acide shikimique

La voie de shikimate fournit un itinéraire alternatif aux composés aromatiques, en particulier les acides aminés aromatiques qui sont : phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Le phosphoénolpyruvate avec l'érythrose-4-phosphate, forment le shikimate [37]. Les phénylpropanes, sont des métabolites du shikimate susceptibles de se cycliser et d'aboutir à la formation des coumarines, de se dimériser comme dans le cas des lignanes, ou de se polymériser formant alors des lignines. Les flavonoïdes et les stilbènes résultent d'un allongement de la chaîne latérale [38].

1.4.2 La voie d'acétate / malonate

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl CoA [36].

1.5 . Activité biologique des polyphénols

Les polyphénols naturels ont montré de nombreuses activités biologiques et des bienfaits pour la santé pour la prévention et le traitement des maladies liées à l'âge, des cancers, des maladies cardiaques, etc. [39].

1.5.1 Activité antioxydant

Les flavonoïdes sont des composés avec une activité anti-oxydante prononcée [40], qui sont considérés comme des agents antioxydants très puissants en raison de leur structure, se rapportant en particulier à la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique importante [41-43].

1.5.2 Activité antimicrobienne

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité [44]. L'activité antimicrobienne est donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuse études, cette activité est due principalement à la capacité des ces

molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes [45].

1.5.3 Activité anti-inflammatoire

Les flavonoïdes possèdent entre autre une capacité anti-inflammatoire [46].ils sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La quercitrine a un effet anti-inflammatoire en inhibant quelques enzymes de synthèse tel que la cyclooxygénase [47]. A doses élevées, les flavonoïdes inhibent les fonctions lymphocytaires mais à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulant chez les sujets immunodéprimés, et la capacité des flavonoïdes pour inhiber la formation des eicosanoides et de l'histamine et de leur pouvoir piègeur des radicaux libre d'autre part[48] .

1.6 Méthodes d'extraction des polyphénols

1.6.1 Méthodes classiques d'extraction

a)Macération

La macération consiste à tremper une poudre grossière de matières naturelles dans un solvant approprié à température ambiante ou sous chauffage doux. Cela permet aux ingrédients actifs de se diffuser dans le solvant, atteignant ainsi l'objectif d'extraction. Cette méthode convient à l'extraction de produits naturels qui sont sujets aux dommages causés par la chaleur et contiennent de grandes quantités d'amidon, de mucilage, de gomme et de pectine [49-52].

b)Décoction

La décoction consiste à chauffer et à faire bouillir la poudre brute de matières naturelles dans l'eau et à la conserver pendant une certaine durée, afin que les ingrédients naturels puissent être lessivés. L'eau doit être utilisée comme solvant lors de l'extraction de matières naturelles par la méthode de décoction. Bien que la méthode d'extraction par décoction soit assez efficace, elle n'est pas recommandée pour les matériaux riches en amidon, en composés mucilagineux, en composants volatils ou en produits chimiques qui se dégradent rapidement en présence de chaleur [53].

d) Extraction a reflux

L'extraction par reflux est une méthode qui utilise des solvants organiques volatils, tels que l'éthanol, pour extraire les composants des matières premières. Le liquide extrait est chauffé et distillé, le solvant volatil se condensant et retournant au récipient d'extraction pour un trempage répété de la matière première. Ce cycle est répété jusqu'à l'extraction complète à

reflux des composants actifs. L'extraction par reflux améliore le taux d'extraction et réduit l'utilisation de solvants. Les principaux facteurs affectant la méthode d'extraction par reflux sont le rapport matériau/liquide, le temps d'extraction et la concentration des réactifs organiques [54,55].

1.6.2 Méthodes moderne d'extraction

1.6.2.1 Extraction par ultrasons (EAU)

L'extraction des composés bioactifs par ultrasons est une technique simple, efficace et peu coûteuse [56] qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant. Elle est facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie. En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps soumise à l'action des ultrasons. Elle a été reconnue pour son application potentielle dans l'extraction des huiles essentielles (carvone, gingerols, huile d'amande), des protéines (soja), des polyphénols, des anthocyanines, des saponines, des polysaccharides ainsi que dans la pasteurisation et la production de produits laitiers. [56]

1.6.2.2 Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'utilisation du EAM dans l'extraction de produits naturels a commencé à la fin des années 1980 et, grâce aux développements technologiques, il est devenu l'une des méthodes d'extraction les plus populaires et les plus rentables disponibles. Cette méthode permet d'effectuer plusieurs extractions quantitatives d'échantillons en quelques minutes, avec une reproductibilité améliorée et une consommation de solvant réduite. Une température élevée et un contrôle de la température peuvent également être obtenus en utilisant ce processus. [57].

1.6.2.3 Extraction par fluides supercritiques (EFS)

L'extraction par fluide supercritique est une technique relativement récente qui présente divers avantages par rapport aux méthodes conventionnelles. Elle se fait à de basses températures favorables à l'extraction des composés thermosensibles. Elle permet aussi d'augmenter le rendement d'extraction de ces composés [58]. Le point critique d'une substance pure est le plus haut point de température et de pression auquel la substance est à l'état d'équilibre liquide-vapeur. Au-dessus de ce point, un fluide se forme et cet état est appelé état supercritique. Le fluide supercritique possède fois les caractéristiques du gaz et du liquide. Ce fluide de faible viscosité, de faible tension de surface et de fort coefficient de diffusion peut pénétrer les micropores des cellules végétales afin d'extraire au mieux les biomolécules [59]. Il peut ainsi permettre l'extraction d'une large variété de composés organiques.

Chapitre II Généralité sur sur le Pin d'Alep

1.1 Généralité

Le genre *Pinus*, appartenant à la famille des Pinacées (Abiétacées), est divisé en trois sous-genres qui sont *Pinus*, *Ducampopinus* et *Cembrapinus*. Ces sous-genres sont divisés en sections. L'espèce *Pinus halepensis* Mill. fait partie de la section Halepensoïdes qui est divisée en trois groupes parmi lesquels le groupe halepensis qui se caractérise par des feuilles à deux aiguilles et à cônes caducs [60, 61]. Le pin d'Alep appartient à un groupe de pins dans lequel plusieurs espèces ont été décrites, mais dont deux seulement sont actuellement considérées comme de véritables espèces par la majorité des systématiciens. Il s'agit de *Pinus halepensis* Mill. et de *Pinus brutia* Ten. [62].

1.2 Description botanique

Le Pin d'Alep est un arbre de taille moyenne de hauteur totale allant de 25 à 27 m. Sa longévité ne dépasse généralement pas 150 ans, il se rencontre dans les étages bioclimatiques méditerranéens ; arides supérieurs, semi-arides, sub-arides et humide. C'est une espèce héliophile et xérophile. Le Pin d'Alep a généralement un tronc tortueux, irrégulier et branchu [60].

- **L'écorce** : Riche en tannin, est d'abord lisse de couleur argentée, puis devient crevassée avec des écailles de couleur gris-brunâtre [63].
- **Les aiguilles** Sont fasciculées par 2 dans le brachyblaste (rarement 3 à 5), filiformes, molles, vert jaunâtre, de moins de 1 mm d'épaisseur, 6 à 10 cm de long [64].
- **Les bourgeons** Non résineux, sont cylindriques, allongés, à écailles brunes libres frangées de blanc [64].
- **Les fleurs** sont monoïques : les fleurs males, en chatons rosâtres, se localisent à la base des rameaux et les fleurs femelles se trouvent au sommet en petits cônes violacés [65].
- **Les Cônes** : sont gros d'une taille de 6 à 12 cm avec un pédoncule épais de 1 à 2 cm, ils sont souvent isolés et réfléchis. Ils sont pourpres puis brun lustré avec des écussons aplatis, persistant plusieurs années sur l'arbre [66].
- **La résine** : L'arbre de pin d'Alep peu produire également de la résine grâce à une opération appelée Gemmage. Cette opération consiste à « blesser » le tronc de l'arbre de pin d'Alep pour que ce dernier envoie de la résine afin de cicatriser cette blessure [66].



Figure II.1 : Description morphologique du pin d'Alep

I. 3 Classification

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

La systématique du pin d'Alep établie par Farjon [67] se résume comme suit :

Tableau I.1 : Position taxonomique de pin d'Alep

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement :	Spermaphyte
Sous embranchement	Gymnosperme
Classe	Coniférophyte
Ordre	Coniférale, Pinoïdine, Pinale
Famille	Pinaceae (Abietaceae)
Sous famille	Pinoideae
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus Halepensis</i>

a) Noms vernaculaires

- **Français** : Pin d'Alep, Pin blanc, Pin de Jérusalem [60].
- **Arabe** : Sanawbar halabi
- **Berbère** : Azoumbei, tayada

1.4 Répartition géographique du pin d'Alep

1.4.1 Dans le monde

Le pin d'Alep est disponible dans le bassin occidental de la Méditerranée à l'exception de l'Égypte, l'Europe, et l'Afrique du Nord. Cet arbre est abondant en Algérie, en Tunisie et au Maroc [68]. Il occupe une superficie estimée de 2.5 millions d'hectares dans la Région méditerranéenne [69]. En Tunisie par exemple, il couvre environ 370.000 ha de la surface arboricole, alors qu'au Maroc il occupe une superficie de 65.000 ha répartit dans le Rif, le moyen et le haut de l'Atlas [70]. En France, cet arbre couvre des surfaces qui dépassent 36.000 ha et qui peuvent atteindre jusqu'à 232.000 ha [71], alors qu'en Italie la surface totale qu'il occupe est estimée de 20.000 ha [72,73].

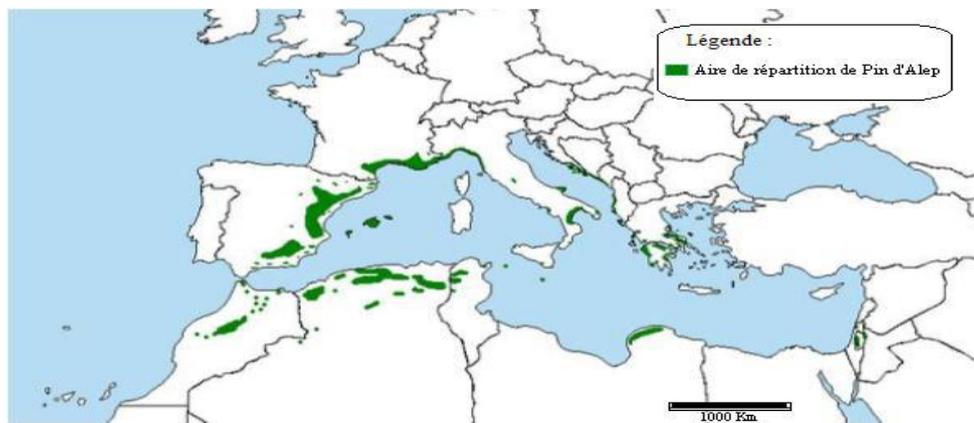


Figure 1.2 : Aire de répartition du Le pin d'Alep dans le monde [74]

1.4.2 En Algérie

En Algérie, la superficie du sol occupée par le pin d'Alep est estimée de 1 1585 333 ha, c'est à dire environ 35 % de la surface arboricole. Cet arbre est assez répandu en Est et en Ouest, tout en passant par le centre. Dans la région de l'Est, il s'est développé dans les forêts des monts de Tébéssa et des Aurès. Dans la région du centre, il se localise au niveau des forêts d'Ouarsenis. En Ouest, il est très bien représenté dans les zones suivantes : Mascara, Sidi Bel Abbes, les montagnes boisées de Saïda, et l'Atlas saharien, dans les forêts des monts Ouled Nail, près de Djelfa et Djebel Amour, près d'Aflou [75].

1.5 Résine de pin d'Alep

1.5.1 Définition

La résine est le principal produit de cette espèce. Elle s'écoule d'abord fluide, puis se concrète en s'oxydant en masses solides cassantes jaunâtres et translucides insolubles dans l'eau mais solubles dans l'alcool, fusibles mais non volatiles [76].

1.5.2 Composition chimique

Elles correspondent à des mélanges liposolubles de composés terpénoïdes volatils et/ou non volatils et de composés phénoliques qui sont sécrétés dans les structures spécialisées localisées à l'intérieur ou à la surface des organes de la plante [77].

a) Résines terpéniques

De la résine du pin d'Alep on tire les monoterpènes, ainsi que la térébenthine qui se caractérise par un pourcentage élevé en α -pinène. L'essence de térébenthine qui a pourvu de 89% de α -pinène (figure 04), a montré une bonne activité antibactérienne et antifongique [78].

b) Résines phénoliques

Les résines phénoliques constituent une source importante de biomasse pour des fuels et entrent souvent dans la composition de remèdes employés en médecine traditionnelle. Leurs constituants dérivent d'hydrates de carbone produits au cours de la photosynthèse et les diverses voies métaboliques[77].

1.5.3 Caractéristiques

La résine de pin d'Alep est une substance riche en cannabinoïdes et terpènes. Elle s'écoule d'abord fluide, puis se solidifie en contact avec l'air sous forme d'une masse solide, cassante, jaunâtre et translucide. Elle est insoluble dans l'éther de pétrole, mais soluble dans l'alcool [76].

1.5.4 Récolte de la résine

La récolte est principalement au printemps se fait manuellement à l'aide d'un couteau et ensuite mise dans des sachets en plastique ou bien dans des sachets en papier ou dans des boîtes à matière variable (métal, porcelaine, verre, plastique). La résine pure sans brin de bois du tronc ou des branches se conserve seule pour usage interne, tandis que la résine prélevée avec des morceaux de bois est destinée à l'usage externe. Elle se conserve facilement et pour de longue durée [78].

1.5.4.1 Méthode traditionnelle

Le gemmage est une technique d'extraction de la résine à partir des arbres de pin d'Alep âgés de 30 ans [79]. Selon le « Système de Hugos", breveté en 1844, le gemmage consiste à réaliser une blessure à l'aide d'un outil (hâpshot) au niveau de l'écorce de l'arbre. La gemme s'écoule vers un pot placé en bas de la care, et coincé par un clou et une lamelle en Zinc .A la fin de l'extraction, l'acide sulfurique est appliqué sur la surface de la blessure, ce qui empêche sa cicatrisation, et renforce sa biosynthèse [81,81].



Figure II.3 : Méthode de gemmage traditionnelle [82]

1.5.4.2 Méthode moderne

Il s'agit d'une récolte dans un récipient en plastique clos fixé à l'entaille afin d'éviter l'oxydation de la résine avec l'air [83]. Un pique sera réalisé à l'aide d'une perceuse équipée avec une scie à cloche. A la fin un acide organique naturel est appliqué au lieu de l'acide sulfurique, afin de protéger l'arbre [84].



Figure II.4 : Méthode de gemmage en vase clos [82].

1.5.5 Utilisation de la résine

- La poudre de la résine, est utilisée pour le traitement de maladies respiratoires comme l'asthme, la bronchite, et la toux [85].
- En médecine traditionnelle algérienne, la résine de pin d'Alep est considérée comme antiseptique puissant. Elle a des formes d'usages externes et internes.

- Pour les usages externes, elle est utilisée afin de prévenir et de traiter les maladies infectieuses respiratoires, pulmonaires, grippe, rhumatisme, maladies infectieuses fongiques, et la sinusite, en la mélangeant soit avec le miel ou l'huile d'olive, puis l'appliquer sur le dos, la poitrine ou sur les parties infectées.
- Pour les usages internes, elle est incorporée à l'état liquide dans l'huile d'olive, ou bien à l'état solide dans le miel. L'administration de ces mélanges se fait une fois par jour [86].

1.6 Emballage bioactif

L'emballage bioactif peut être défini comme une stratégie d'emballage innovante [87], pour rôle unique d'améliorer l'impact des aliments sur la santé des consommateurs, la formation de ce système implique également l'ajout de composés bioactifs ou fonctionnels dans le matériau d'emballage qui peuvent ensuite interagir avec le produit alimentaire en le libérant de manière contrôlée ou en capturant les substances générées par les aliments ou présentes dans ces derniers [88]. Toutefois, un tel emballage doit être conçu en tenant compte de la stabilité des agents bioactifs pendant le traitement et le stockage des aliments emballés [89]. L'emballage actif est appelé emballage bioactif lorsque son rôle unique est d'améliorer l'impact des aliments sur la santé du consommateur [89].

1.6.1 Agents bioactifs

Les substances bioactives qui conviennent à l'incorporation dans l'emballage comprennent les composés organo-sulfurés, les stérols végétaux, les mono-terpènes, les fibres alimentaires solubles, les extraits de plantes, les huiles essentielles, les prébiotiques et probiotiques, les vitamines encapsulées, les composés phénoliques et les huiles marines...etc. [90]. Les matériaux d'emballage bioactifs doivent conserver ces composés dans des conditions favorables jusqu'à ce qu'ils soient libérés de manières contrôlables dans le produit alimentaire [91].

1.6.2 Rôle d'emballage bioactif

Les emballages bioactifs peuvent contribuer à contrôler l'oxydation des produits alimentaires et empêcher la formation de mauvais goûts et de textures indésirables [91]. Mis à part leur intérêt pour des raisons environnementales, les enrobages et films bioactifs peuvent également être utilisés en tant que support d'agents antimicrobiens [92] (Figure II.4).

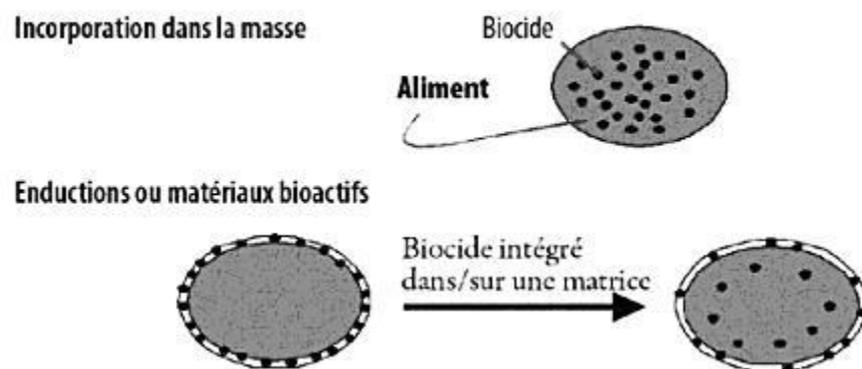


Figure II.4: Libération progressive de biocide par l’emballage bioactif [92]

1.6.3 Utilisation des films bioactifs dans l’industrie alimentaire

L’utilisation de films bioactifs (biodégradables) dans l’industrie alimentaire présente plusieurs avantages par exemple :

- ✓ les films bioactifs peuvent emballer de petites portions de produits dans des dosettes individuelles (café, thé, cacao, soupe déshydratée....etc.) ou même des additifs alimentaires ;
- ✓ Ils peuvent réduire les emballages secondaires multicouches complexes à une seule couche parfaitement recyclable ;
- ✓ Ils peuvent prolonger la durée de conservation des aliments en garantissant leur sécurité, qualité nutritionnelle et sensorielle [93].

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériels et méthodes

1.1 Introduction

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'une ressource végétale de point de vue activités biologiques et composition chimique de leur principe actif. Dans ce contexte notre étude est basée sur l'extraction, l'identification et la quantification des composés phénoliques, suivi par l'évaluation des activités biologiques à savoir la capacité antioxydant et l'activité antibactérienne de ces extraits.

1.2 Préparation de matériel végétal

La gomme du pin d'Alep a été achetée chez un herboriste au niveau de la ville de Tiaret. L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département de biologie végétale de la faculté sciences de la nature et vie université Tiaret.

1.2.1. Séchage de la résine

Une masse de la gomme (70g) est d'abord lavée avec l'eau distillée, puis séchée à 45°C dans l'étuve pendant 24h, pour assurer l'élimination complète d'eau dans l'échantillon.

1.2.2. Broyage

Les petites pierres de la gomme ont été broyées manuellement à l'aide d'un mortier pour obtenir une poudre fine.

1.2.3. Tamisage

Le broyat de la gomme a été tamisé à travers un tamis de 0,230 mm de diamètre afin de récupérer une poudre très fine, puis conservée soigneusement dans des flacons fermés, à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'au jour de leur utilisation.

1.3 Extraction des polyphénols par reflux

1.3.1 Mode opératoire

Des extraits chloroformiques sont préparés par chauffage sous reflux de 5 g de la poudre dans 100 ml de chloroforme pendant 1 heure. Les extraits sont récupérés dans un premier temps après filtration du mélange filtrées sous vide à l'aide de papier filtre et concentré par une évaporation dans l'étuve. Ensuite, les extraits obtenus ont été pesés. Chaque expérience a été réalisée en triple. Les extraits secs obtenus ont été ensuite conservés dans des flacons jusqu'à leurs utilisations.

I.3.2 Conservation de l'extrait

Les extraits obtenus sont conservés dans des flacons à une température de 4°C et à l'abri de la lumière en utilisant un papier d'aluminium qui empêche le contact de l'extrait avec la lumière.

I.3.3 Rendements des extractions

Le rendement est la quantité d'extrait obtenue à partir d'une matière végétale. Il est exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche (poudre végétale) et a été calculé selon la formule :

$$R \% = \left(\frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{éch}}} \right) \times 100$$

R : est le rendement en %.

M_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant (g).

M_{éch} : la masse sèche de l'échantillon végétal (g)

I.4 Analyse qualitatif

I.4.1 Analyse des extraits par infrarouge IR

L'infrarouge est une méthode très utilisée pour la caractérisation et l'identification des composés ou de leurs groupements fonctionnels (liaisons chimiques) dans un mélange d'extraits. L'identification des liaisons se fait à l'aide du nombre d'onde correspondant et la détermination de groupe caractéristique par un spectre d'un composé inconnu qui sera identifié par comparaison à la bibliothèque des composés connus [94]. La composition chimique des quatre extraits de la gomme ont été scannés dans la gamme entre 400 et 4000 cm⁻¹, avec un spectromètre de type ALPHA-P BRUKER. Les analyses ont été réalisées dans le laboratoire de chimie des matériaux de l'Université d'Oran1.

I.5 Analyse chimique

I.5.1 Criblage phytochimique

Les extraits obtenus ont été évalués phytochimiquement pour déterminer la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de phénols, de saponines, de terpénoïdes, de stéroïdes, de tanins, selon les méthodes standards. Tout changement de couleurs ou la formation de précipité a été utilisée comme indicateur d'une réponse positive à ces tests [95-101].

a) Test Flavonoïdes

Test (a)-À 1 ml d'extrait aqueux, 1 ml d'hydroxyde de sodium à 10% était ajouté. La présence de flavonoïdes est indiquée par la formation de couleur jaune à orange .

Test (b) -À 1 ml d'extrait alcoolique, 1 ml de concentré de l'acide sulfurique a été ajouté. La présence de flavonoïdes est confirmée par la formation de l'orange au rouge cramoisi .

b) Test Tannins

Deux ml de chacun des extraits ont été dilués avec eau distillée dans des tubes à essai séparés et 2-3 gouttes de chlorure ferrique à 5% (FeCl_3) a été ajouté. Un vert-noir ou une coloration bleue indiquerait la présence de tanin.

c) Test Phénols

Test du chlorure fer : 1ml de chaque extrait liquide avec quelques gouttes d'une solution de Chlorure de fer FeCl_3 à 10% sont rajoutées. La réaction donne une coloration bleu-noir en présence des phénols.

d) Test Quinones

A 1 ml d'extrait alcoolique, 1 ml. De l'acide sulfurique concentré a été ajouté. La présence de quinones est indiquée par la formation de la couleur rouge .

e) Test Stéroïdes

1 ml d'extrait, 2 ml d'extrait de chloroforme ,2 ml l'acide sulfurique concentré a été ajouté lentement sur la paroi du tube. La présence de stéroïdes est indiquée par la formation de deux couches, une couche rouge et une couche inférieure vert jaunâtre.

f) Test Alcaloïdes

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

g) Test Saponines

A 1 ml d'extrait aqueux, 5 ml de l'eau a été ajoutée, le tube a été agité pendant 2 minutes. La présence des saponines sont indiquées par la formation de mousse .La formation de mousse stable après 15 min confirme le test

h) Test Terpénoïdes

A 2 ml d'extrait, 1 ml d'acétique l'anhydride a été ajouté, suivi par l'addition lente de 1 ml d'acide sulfurique concentré. La présence de triterpénoïdes est indiquée par formation de couleur blanc rougeâtre.

i) Test Coumarines

A 1 ml d'extrait alcoolique, 1 ml de 10% de l'hydroxyde de sodium a été ajouté. La présence de coumarines est indiquée par la formation de couleur jaune dont la fluorescence sous ultraviolets léger .

I.6 Analyses quantitatives des extraits***I.6.1 Dosage des phénols totaux******a) Principe de la méthode***

La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdène-phosphotungstène du réactif de Folin Ciocalteu par les phénols donnant un complexe de couleur bleue dont la concentration peut être suivie par mesure de l'absorbance [102].

b) Préparation de la gamme détalonnage

La gamme étalon est obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. On prend 5mg de l'acide gallique et on le dissout dans 25 ml de Méthanol pour obtenir la solution mère S_m (200 μ g/ml). On prépare des dilutions dans des tubes à essai allant de 80 à 200 μ g/ml selon le tableau suivant :

Tableau I.1: Préparation des dilutions d'acide gallique

N° tube	1	2	3	4	5	6
C (μ g/ml)	80	100	120	140	160	180
V d'acide gallique (μ l)	400	500	600	700	800	900
V méthanol (μ l)	600	500	400	300	200	100

On introduit dans des tubes à essai un volume de 50 μ l de dilutions d'acide gallique avec 250 μ l de réactif de Folin Ciocalteu et 3ml de l'eau distillé après 750 μ l de carbonate de sodium NaCO_3 (7%) sont additionnés. Le mélange a été bien agité puis incubé pendant 8 min à température ambiante. Ensuite, une dose de 950 μ L d'eau distillée a été ajoutés. Le mélange a été laissé à reposer 2 h à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 765 nm contre de l'eau distillée comme blanc.

d) Expression des résultats

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (80-200 μ g/ml). La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligramme (mg) d'équivalent d'acide

gallique par gramme d'extrait (mg d'EAG/g d'extrait) .cette teneur en polyphénols totaux (CPT_S) sont calculés selon la formule suivante [103]

$$\text{Dont: } T = [(C \times V \times D) / P] \times 100$$

T: Teneur en polyphénols totaux (mg GAE /g d'extrait);

C: Concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduite de la courbe;

D: Facteur de dilution;

P: Poids de l'échantillon (g);

V: volume de la solution analysée (ml).

1.6.2 Dosage des flavonoïdes totaux

a) Principe de la méthode

La quantification des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium AlCl₃ .Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position 5 susceptible de donner en présence de trichlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al⁺³. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité du flavonoïde présent dans l'extrait [104,105].

b) Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme étalon est obtenue en utilisant la quercétine comme standard de calibration. On prend 5 mg de la quercétine et on le dissolvé dans 25ml de méthanol pour obtenir la solution mère (S_m) de concentration 200µg/ml, on prépare des dilutions dans des tubes à essai allant de 80 à 200µg/ml selon le tableau suivant :

Tableau I.2: Préparation des dilutions de la quercétine

N° tube	1	2	3	4	5	6	8
C (µg/ml)	20	30	40	60	70	80	100
V _{quercetin} (µl)	100	150	200	300	350	400	500
V _{méthanol} (µl)	900	850	800	700	650	600	500

Dans des tubes a essai on met 250µl de chaque dilution de la Quercétine, avec 1 ml d'eau distillée et 75µl de solution de nitrite de sodium NaNO₂ à 0.5% . Après 6 minutes, on ajoute 150µl d'AlCl₃ à 10% et laissés pendant 5 minutes. Ensuite 500µl de d'hydroxyde de sodium NaOH à 4% sont ajoutés avec 2.5 ml d'eau distillé. Le mélange est bien agiter jusqu'à

l'apparition d'une couleur jaunâtre. L'absorbance est mesurée après 15 minutes 'incubation à 510 nm contre un blanc (eau distillé).

c) Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été établie à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie avec la Quercétine. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents de Quercétine par gramme de l'extrait (mg EQ/g d'extrait). La teneur en flavonoïdes totaux (TFC) est calculée selon la formule suivante [106]:

$$TFC = \frac{(C \times V)}{m}$$

où ;

C : Concentration obtenue à partir de la courbe standard ($\mu\text{g/ml}$);

V : Volume de solution mère (ml);

m : Poids d'extrait sec (g).

1.6.3 Dosage de tanins condensés

a) Principe

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide. Le principe de ce dosage est basé sur la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des catéchine et la formation de complexes rouges, cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge qui absorbe la lumière à 500 nm [107].

b) Préparation de la gamme d'étalonnage

La gamme étalon est obtenue en utilisant la catéchine comme standard de calibration. On prend 25mg de la catéchine et on le dissout dans 25ml de méthanol pour obtenir la solution mère (S_m) de concentration $1000\mu\text{g/ml}$, on prépare des dilutions dans des tubes à essai allant de 400 à $900\mu\text{g/ml}$ selon le tableau suivant :

Tableau I.3: Préparation des dilutions de la catéchine

N° tube	1	2	3	4	5	6	8
C ($\mu\text{g/ml}$)	400	500	600	700	750	800	900
V _{quercetin} (μl)	400	500	600	700	750	800	900
V _{méthanol} (μl)	600	500	600	700	750	800	900

Un volume de 50 µl de chaque dilution de la catéchine a été mélangé avec 3 ml de solution de vanilline-méthanol à 4% et 1.5 ml d'acide chlorhydrique concentré, et le mélange a été laissé reposer pendant 15 minutes. L'absorbance a été lue à 510 nm contre le blanc (eau).

c) Expression des résultats

Les concentrations des tannins condensés sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage de la catéchine. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents catéchine par milligramme d'extrait (mg ECT/g d'extrait). La teneur en tannins (TC) sont calculés selon la formule [108] :

$$Tc = \frac{C \times V}{m}$$

Avec

Tc: Teneur en tanins (mg ECT/g d'extrait sec de la plante) ;

C : Concentration en tannins en mg/ml déterminé à partir de la courbe d'étalonnage (µg/ml.

V : Volume de l'extrait (ml)

m : Poids de l'extrait sec (g)

1.7 Détermination de l'activité antioxydant

L'évaluation de la capacité antioxydant a été réalisée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH .

1.7.1 Principe

Le test DPPH a été largement utilisé pour évaluer l'efficacité de piégeage des radicaux libres de diverses substances antioxydantes [109]. Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants à réduire le radical libre 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl, soit par un mécanisme de libération d'un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle, soit par libération d'un électron. Le radical a un maximum d'absorption mesurable par spectrophotométrie à 515 nm et sa neutralisation par un antioxydant peut-être facilement suivie par spectrophotométrie UV/vis [110].

et pathologie animale, université de Tiaret. Les microorganismes testés sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau I.4 : Les souches bactériennes utilisées

Nom de la souche	Gram	Famille
<i>Escherchia Coli</i>	-	Enterobacteriaceae
<i>Bacillus Cereus</i>	+	Bacillaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Micrococcaceae
<i>Bacillus subtilis</i>	+	Bacillaceae

b) Milieux de cultures

Les milieux d'identifications tels que les géloses nutritives, ont été utilisées pour confirmer la nature des souches bactériennes. La gélose Mueller Hinton (MH) et le bouillon Mueller Hinton préparés à partir de milieux déshydratés, ont été utilisées respectivement pour les tests de sensibilités et la vivification les souches

c) Stérilisation du matériel

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes ont été stérilisés en premier à sec dans un four pasteur, les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) les flacons, les milieux de culture (GN, MH), l'eau distillé, l'eau physiologique, les embouts pour micro pipette, ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

1.8.2 Repiquage des souches bactériennes

Dans des conditions stériles, Les souches bactériennes teste ont été ensemencées par la méthode des stries serrés sur des boites de pétri contenant le milieu gélose nutritive GN puis incubés à 37°C pendant 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes. Ces derniers ont servi à préparer l'inoculum.



Figure I.2 : Repiquage des souches bactériennes

1.8.3 Préparation de suspension bactérienne

Les différentes bactéries ont été cultivées dans gélose nutritive pendant 24 h à 37 °C. Outre la culture fraîche, la suspension bactérienne a été préparée à l'aide d'une anse stérile en platine où une ou deux colonies ont été collectées et placées dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile puis la suspension bactérienne a été homogénéisée à l'aide d'un vortex. La densité optique a été calibrée à 0,5 Mc Farland à 625 nm. La densité spectrosopique de l'inoculum a été mise à jour à une concentration de 10^8 UFC/ml.

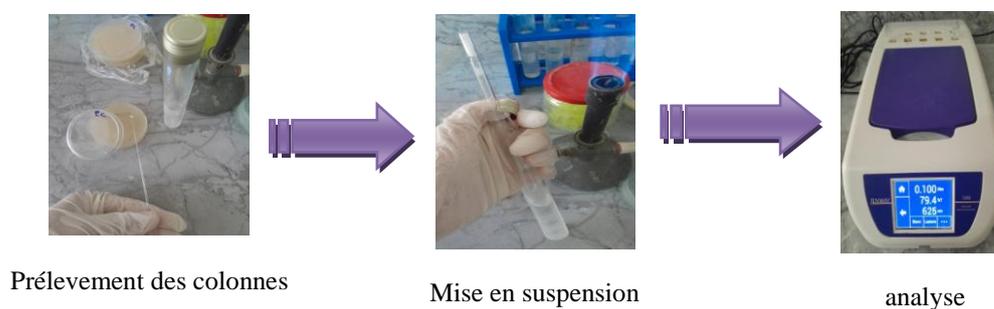


Figure I.3 : Préparation de l'inoculum

1.8.4 Ensemencement

Le milieu Mueller-Hinton en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri en raison de 15ml dans chaque boîte. Après solidification du milieu de culture, un écouvillon stérile imbibé par la suspension bactérienne est étalé sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas en stries serrées à trois reprises, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de pivoter l'écouvillon sur lui-même, et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

1.8.5 Méthode de diffusion des puits

L'activité antibactérienne des différents extraits étudiés a été réalisée suivant la méthode des puits sur gélose, cette technique permet de déterminer la sensibilité des germes vis-à-vis des extraits végétaux étudiés.

1.8.5.1 Premier protocole

a) Mode opératoire

L'activité antibactérienne des extraits a été évaluée par la méthode de diffusion des puits. 100µl d'inoculum bactérien ajusté à la norme 0,5McFarland a été inoculée dans des plaques de Mueller Hinton. Quatre puits ont été réalisés dans chaque boîte avec des pipettes Pasteur stériles. Un volume de 100 µl de différentes concentrations d'extrait est introduit dans chaque puits. Les boîtes de Pétrie ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Chaque teste a été répétée deux fois.

1.8.5.1 Deuxième protocole

b) Mode opératoire : L'activité antibactérienne des extraits a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur puits. Un coton-tige stérile a été plongé dans la suspension bactérienne standardisée (0,5 McFarland) puis L'écouvillon a ensuite été étalé uniformément dans trois directions sur toute la surface des plaques Muller Hinton pour obtenir des inocula uniformes. Quatre puits ont été percés dans chaque boîte de pétries, après 100 µl d' extrait a été distribué dans chaque puits. Les plaques de gélose Mueller-Hinton inoculées ont été conservées au réfrigérateur pendant 30 minutes pour permettre aux extraits de diffuser dans la gélose, puis ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Les zones d'inhibition de souches bactériennes testées ont été enregistrées.

Les boîtes pétries ont été laissé diffuser pondant 40min à température 4°C, puis incubées à 37°C pendant 24 h. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et enregistré.

I.8.5.1 Troisième protocole

b) Mode opératoire : La méthode de diffusion dans les puits d'agar a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de diverses matières végétales. Un volume de la culture bactérienne fraîche a été étalé avec un écouvillon stérile sur une plaque de milieu Mueller. Quatre puits de 8,0 mm de diamètre ont été réalisés à l'aide d'une pipette pasteur. Egalement un volume de 100µl des concentrations croissantes d'extrait a été placé dans chaque puits, puis incubées à 37°C pendant 24 h. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et enregistré.

I.8.6 Méthode de diffusion sur disque

Le test de l'activité antibactérienne des quatre extraits est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme), encore appelée méthode des disques. Son principe est inspiré de l'antibiogramme, il consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par diffusion de l'extrait sur le milieu solide et avec la création d'un gradient de concentrations entre le composé et le micro-organisme ciblé.

b) Mode opératoire

Les tests de diffusion sur disque ont été effectués sur les extraits. Un volume d'inoculum de turbidité 0,5 Mc Farland, ont été étalées de manière uniforme sur la surface de gélose Mueller Hinton. Les disques de papier filtre (6 mm de diamètre) ont été chargés avec un volume de 5µl des concentrations croissantes (d'extrait) et disposés à la surface. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24.

II.1 Préparation de film

Le film a été réalisé par la méthode de coulée. Une masse d'amidon de 5g et 3ml de glycérol sont dispersés dans 100 ml de l'eau distillée, le mélange est mis sous agitation à température de 85 à 95°C dans un bain marie, ensuite on ajoute un volume de l'extrait de chloroforme, Ce mélange est ensuite refroidi, coulé dans une boîte pétrie puis séché dans une étuve à 40°C pendant 24h. Le film a été démoulé après leur refroidissement à température ambiante.

II.2 Caractérisation de film

II.2.1 Humidité

Des morceaux de film ont d'abord été conditionnés dans un dessiccateur pendant 48h et (m_1). Le film a ensuite été séché à 105°C dans une étuve pendant 6h et son poids a été à nouveau mesuré (m_2). La teneur en humidité a été calculée comme suit.

$$MC = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100$$

MC : la teneur d'humidité(%)

m₁ : poids de l'échantillon avant séchage (g)

m₂ : poids de l'échantillon après séchage (g)

II.2.2 La solubilité dans l'eau

La solubilité dans l'eau est une propriété importante de film à base l'amidon. Les applications potentielles peuvent nécessiter une insolubilité dans l'eau pour améliorer l'intégrité du produit et sa résistance à l'eau.

II.2.2.1 Mode opératoire

En premier lieu le film à été découpé en morceau carrée, séchés pendant 24h à une température 90°C, puis pesé pour obtenir la matière sèche initiale (W_i). Le film séché à été immergé dans 50 ml d'eau distillée, sous agitation constante pendant 6 h à 25°C, ensuite, Après cela, le film à été filtré et séchés à 90°C jusqu'à poids constant (W_f).

La solubilité dans l'eau (%) du film a été calculée selon l'équation suivante :

$$W_s(\%) = \left(\frac{W_i - W_f}{W_i} \right) \times 100$$

W_s (%) : Solubilité dans l'eau

W_i : poids sec initial

W_f : poids sec final.

II.3 Acticité antioxydant du film

La capacité antioxydant de film a été mesure par méthodes de piégeage des radicaux DPPH.une échantillon de film à été solubilisé dans 3ml de méthanol, puis une aliquote de le film solubilisé (0,5ml) a été ajouté à 2,5ml de solution de radical DPPH , le mélange a été maintenue dans l'obscurité jusqu'à ce que la l'absorbance de la solution s'est stabilisée ensuite , le l'absorbance a été mesurée à 517nm . La capacité antioxydant était calculée à l'aide de l'équation suivant :

$$I\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

I % : Taux du DPPH piégé ou taux d'inhibitions.

A_0 : Absorbance du contrôle (solution de DPPH –blanc).

A_1 : Absorbance des extraits d'échantillon.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois.

II.4 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne du film a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Les cultures bactériennes ont été standardisées à 0,5 McFarland puis diluées. Les suspensions bactérienne ont été étalées de manière uniforme sur les surface de la plaque de gélose à l'aide d'un 'écouvillon stérile. Le film stérilisé à été coupés en disques circulaires et ont été placés au centre sur les plaques de gélose solide. Les boites de pétri ont été incubée à 37 ° C pendant 24 h avant l'examen des zones claires autour de film.

Chapitre II Résultats et discussion

1.1 Rendement des extraits

L'extraction des composés bioactifs de la gomme par la méthode à reflux permis d'obtenir des poudres, dont l'aspect physique, la couleur et le rendement des extraits sont déterminés et représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau II.1 : Les caractéristiques des extraits chloroformiques

Les extraits	Aspect	Couleur	masse (g)	Rendement(%)
Extrait Chloroforme EC	poudre	Maron claire	1,6300	81,50

D'après l'analyse de ce tableau, il ressort que l'extrait chloroforme présente un meilleur rendement d'extraction. Ces résultats sont importants pour les analyses de dosage afin de quantifier les polyphénols totaux et d'évaluer les différentes analyses biologiques.

Beaucoup d'auteurs ont établi que le rendement d'extraction des composés phénoliques varie considérablement selon la polarité du solvant utilisé [112,113]. Ces variations peuvent également être attribuées à la différence d'affinité des composés phénoliques vis-à-vis du solvant d'extraction, à leur degrés de polymérisation ou à leur engagement dans d'autres structures moléculaires formants ainsi des complexes insolubles [114].

1.2. Caractérisation des extraits par spectroscopie infrarouge

Le spectre IR d'extrait obtenu confirme la présence des bandes caractéristiques dont chacun correspond à un groupement fonctionnel donnée.

Les spectres présentent une large bande vers ($3406-3433\text{ cm}^{-1}$) est due aux vibrations d'élongation OH caractéristique des acides organiques, et une bande moyenne d'intensité 2941 cm^{-1} , caractéristique de la vibration d'élongation symétriques C-H des groupes aliphatiques CH_2 et CH_3 , on observe aussi une bande au voisinage de 1695 à 1710 cm^{-1} de groupe carbonyle (C=O) caractéristiques d'acides phénoliques. La bande au voisinage 1495 cm^{-1} est attribuée à la vibration de déformation CH. Les pics au voisinage 1265 à 1160 cm^{-1} , sont attribués à l'étirement des liaisons éther C – O – C dans les cycles. Les pics vers 1018 à 1034 cm^{-1} sont attribués au groupe C-OH des phénols.

I.3 Résultats de criblage phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur les extraits chloroformiques de pin d'Alpe ont permis de détecter les différentes classes de composés existant dans les extraits chloroformiques par des réactions de colorations ou de précipitations. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau II.2 : Résultats du criblage phytochimique des extraits de pin d'Alep

	Extrait Chloroforme
Tanins	+++
Flavonoïdes	+++
Saponines	+++
Alcaloïdes	-
<i>Stéroïdes</i>	+++
<i>Terpénoides</i>	++
Phénols	+++
<i>Quinones</i>	++
<i>Coumarines</i>	++

+++ : Réaction très positive.

++ : Réaction moyennement positive.

+ : Réaction faiblement positive.

– : Réaction négative.

Cet analyse a permis de révéler la présence de composés de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les polyphénols les Tannins et les coumarines, dans les extraits chloroformiques, ce qui indique la richesse de la gomme du pin d'Alep en polyphénols. Ces composés phénoliques, semblent avoir des rôles importants dans les différentes activités biologiques.

I.4 Analyse quantitative

L'étude quantitative des extraits phénoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif de déterminer la teneur totale des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins.

I.4.1 Dosage des polyphénols totaux

L'analyse quantitative des phénols totaux est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimé en mg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

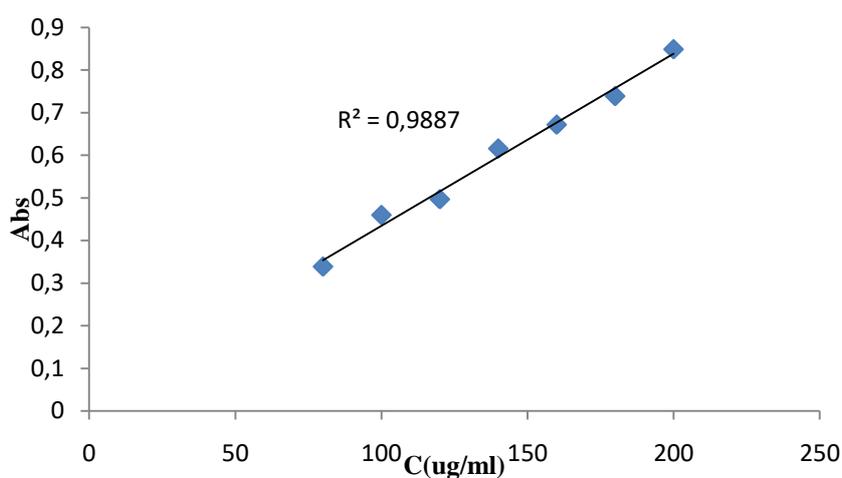


Figure II.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

- ✓ Les analyses quantitatives des extraits préparés confirment la richesse de notre gomme par les composés bioactif (polyphénols)
- ✓ Les résultats en terme de teneurs en polyphénols totaux montrent que l'extrait chloroformique, était plus riche en polyphénols avec une teneur moyenne de 690,17 mg EAG/g.

I.4.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la Quercétine et exprimé en mg équivalent de Quercétine par gramme d'extrait sec. (mg EQ/g)

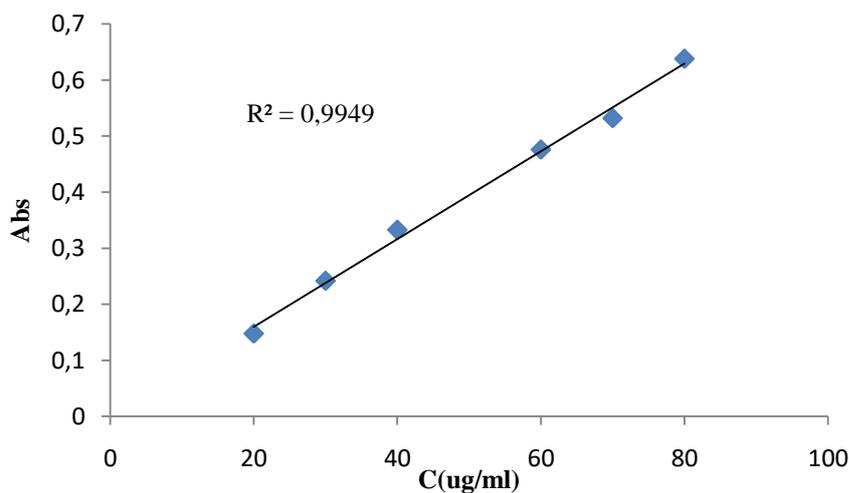


Figure II.2: Courbe d'étalonnage de quercitine

- ✓ On constate que l'extrait chloroformique présente une teneur importante en flavonoïdes avec une teneur de 108,46 (mg EQ/g)

1.4.3 Teneur en tannins condensés

Les teneurs des tannins sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage de catéchine et exprimés en mg équivalent de Catéchine par gramme g d'extrait sec.

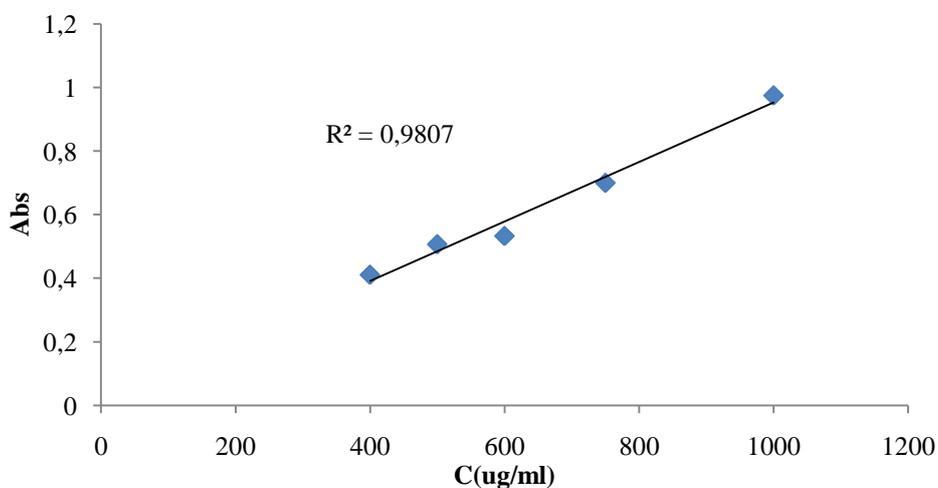


Figure II.3 : Courbe d'étalonnage de catéchine

- ✓ La figure ci-dessous regroupe les résultats de la teneur en composés phénoliques des extraits.

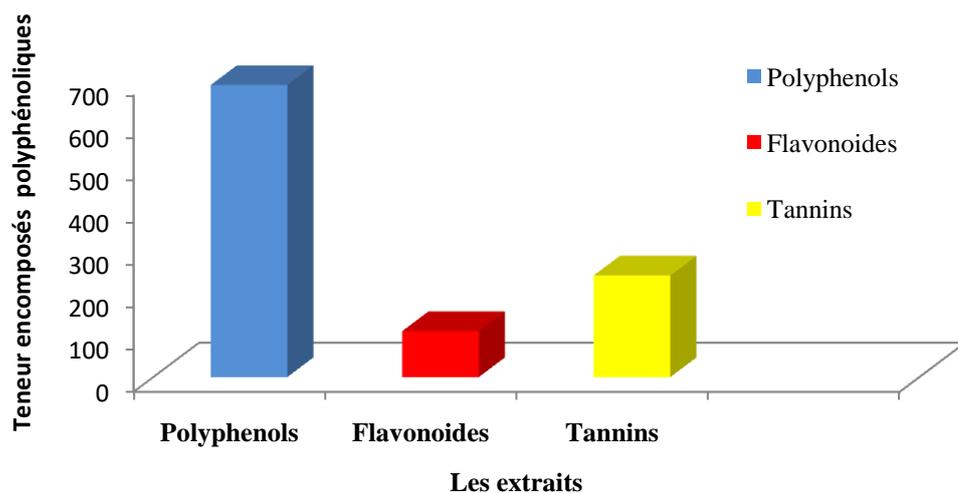


Figure II.4 : Teneur en des composés phénoliques des extraits chloroformiques

- ✓ Les résultats montrent que les extraits chloroformiques présentent une teneur très élevée en tannins avec une valeur moyenne de 240,14 mg ECT/g.

1.5 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

La méthode de piégeage du radical libre (DPPH) a été retenue pour évaluer l'activité antioxydante de notre extrait, car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical [115]. Les résultats de pouvoir anti radicalaire des extraits chloroformiques de la gomme exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans la figure ci-dessous .

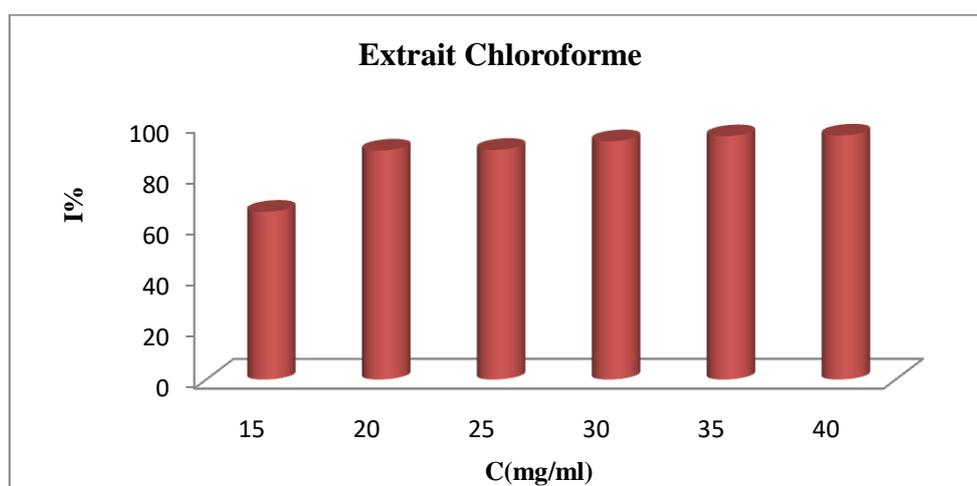


Figure II.5 : Activité de piégeage du radical libre DPPH des extraits

- ✓ On remarque que l'augmentation de la concentration des extraits chloroformiques s'accompagne avec l'augmentation du pourcentage d'inhibition du radical libre.
- ✓ D'après ces résultats, on peut constater que l'activité anti-radicalaire des extraits de la gomme pourrait être attribuée à leurs teneurs très fortes en composés Phénoliques. Aussi, il a été rapporté dans les études de Jayaprakasha et al que l'activité anti-radicalaire dépend de la structure chimique des composés phénoliques et de la disponibilité en groupements hydroxyles (OH) qui leur attribue la capacité de transférer des électrons ou de donner des hydrogènes [116]

1.6 Pouvoir antibactérien des extraits

1.6.1 Test de diffusion sur disque

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien des extraits de la gomme par la méthode de diffusion des disques. Les résultats des différentes concentrations appliqués contre les souches pathogènes sélectionnées sont présentés sur la figure suivante.

- On note que les souches testées révèlent une résistance pour les différentes concentrations appliquée après 24h d'incubations.



EC

Figure II.6 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *Bacillus Cereus*

Ce phénomène peut s'expliquer par l'influence de nombreux facteurs tel que :

- ✓ La faible teneur en substance actif dans cet intervalle de concentration.
 - ✓ La charge supplémentaire des bactéries dans l'inoculum appliqué.

L'activité antimicrobienne ne dépend pas seulement de la présence des composés phénoliques, mais également de la présence de divers métabolites secondaires [117].

1.6.2 Méthode de diffusion des puits

1.6.2.1 Première protocole

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits sont représentés dans les figures ci-dessous .

- On remarque une absence totale de l'effet inhibitrice des extraits sur la croissance des souches sélectionné dans cette gamme de concentration.



EC

Figure II.7 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *Bacillus Cereus*

L'absence des zones d'inhibition des souches testées peut être expliquée par la variation de la composition chimique de chaque extrait ainsi la nature des bactéries et leur sensibilité vis-à-vis l'extrait.

I.6.2.2 Deuxième protocole

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des puits ont été mesurées. Les résultats du test de sensibilité bactérienne sont présentés sur les figures suivantes

- ✓ On remarque que les souches *S. aureus* et *Bacillus cereus* ont présenté une sensibilité remarquable vis-à-vis les antibiotiques testés,



EC

Figure II.8 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis vis *Escherichia coli*



EC

Figure II.9 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis vis *Staphylococcus aureus*



EC

Figure II.10 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *Bacillus . Cereus aureus*

- ✓ L'observation des ces figure confirme le pouvoir antibactérien des extraits traduite par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du puits.
- ✓ On note une action bacteriostatique, des extraits vis-à-vis des souches sélectionnées aussi selon les recherches de Marjorie il rapporte que l'activité inhibitrice des extraits est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, une perte de ces agents influe sur l'activité qui peut être due aux conditions de séchage ou d'extraction [118]
- ✓ . Les résultats obtenus montrent que l'extrait chloroforme présente une bonne activité contre *Bacillus cereus*.

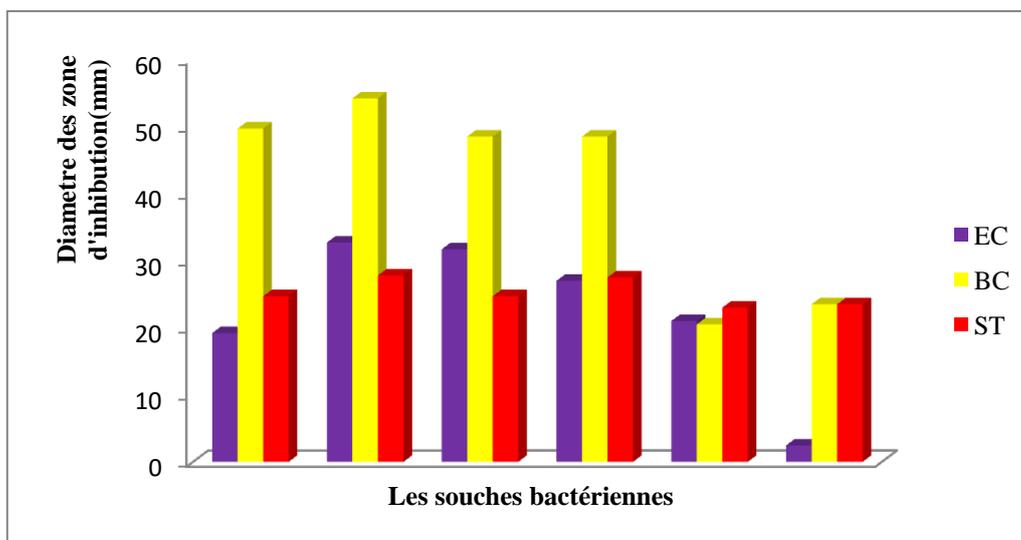


Figure II.11 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des extraits

- ✓ On note une zones d'inhibition très forte pour les extraits tandis que des zone plus faible pour antibiotiques Tobramycine (TOB) et nitrofurantoine (F 300)

1.6.2.3 Troisième protocole

Les observations des effets des différentes concentrations des extraits sur la croissance des souches bactériennes sélectionnées sont représentées dans les figures ci-dessous :



EC

Figure II.12 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

- ✓ On constate que toutes les souches étudiées sont sensibles à ces extraits



EC

Figure II.13 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *Escherichia coli*

- ✓ On constate que toutes les souches étudiées sont sensibles à ces extraits.



EC

Figure II.14 : Activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *Bacillus . Cereus*

- ✓ Les extraits chloroformiques se révèlent actifs, cela est lié à la présence de substances actives (polyphénols).
- ✓ On constate que l'augmentation de la concentration des extraits s'accompagne d'une augmentation du diamètre des zones d'inhibition.
- ✓ Les tests d'activité antibactérienne ont permis de mettre en évidence la présence d'une activité modérée sur les différentes souches testées.

II.1 Caractérisation de film

II.1.1 Caractérisation par spectroscopie d'absorption infrarouge

Les principales bandes de film est regroupée dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.3 : Principales bandes d'absorption infrarouge des films

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Structure associée
3287	Vibration de la liaison OH présente dans l'amidon, glycérol et l'extrait.
2926	Vibration élongation ν_{CH_2} présent dans l'amidon et l'extrait
1685	Vibration élongation C=O présent dans l'extrait
1364	Vibration de déformation de la liaison C-H de l'amidon
1414 à 1334	Vibrations de déformation dans le plan des groupements -CH ₂ et -CH ₃ , contenus dans l'extrait
1150-1076	Vibration élongation des liaisons C-O-H présente dans l'amidon et l'extrait
856 à 922	Vibration de déformation $\nu_{\text{C-H}}$ aromatique présente dans l'extrait.

II.1.2 Humidité

La capacité de rétention d'humidité du film peut être représentée par termes de teneur en humidité.

- D'après les données expérimentales, on constate que la capacité de rétention d'humidité du film atteint une valeur significative.

II.1.3 La solubilité

La solubilité des films comestibles dans l'eau est l'un des paramètres les plus importants affectant leur application finale. En effet, certaines applications nécessitent des propriétés hydrosolubles élevées pour être facilement dissous avant consommation, tandis que d'autres applications nécessitent une faible solubilité dans l'eau pour garantir la résistance à l'eau pendant le traitement et le stockage.

Dans cette étude, le film à base d'amidon / polyphénols à présenté un effet positif dans la teneur en solubilité dans l'eau.

- ✓ Dans les études de Mathew et al ont confirmé que les valeurs élevées de degré de solubilité des films peuvent être attribuées au groupes hydrophiles de polyphénols qui peuvent facilement interagir avec les molécules d'eau [119].
- ✓ Selon l'étude de Menezes Filho et al ont rapporté que plus le pourcentage de solubilité est faible, plus la qualité et la durabilité de l'emballage sera mieux ce qui permet leur utilisation et conservation dans un environnement avec un certain niveau d'humidité relative [120].

II.2 Activité antioxydant

Le test au DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) choisi dans cette étude est basé sur le piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule antiradicalaire, ce qui entraîne la décoloration de ce dernier. Ce test consiste à mettre le radical DPPH en présence d'une molécule dite <antioxydant > afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical.

- Les résultats du test ont révélé que le film élaboré présente un niveau plus élevé d'activité de piégeage des radicaux.

II.3 Activité antibactérienne de film

- ✓ D'après les tests de diffusion sur gélose, l'inhibition des trois souches a été clairement montrée par l'absence des colonies dans la région circulaire directement au-dessus de film.
- ✓ Les tests d'activité antibactérienne ont permis de mettre en évidence la présence d'une importante activité sur les différentes souches testées.
- ✓ Le film actif présente une bonne valeur des zones d'inhibition, ce qui confirme l'existence d'une activité antibactérienne contre les souches testés.
- ✓ On constate que les variations du diamètre de la zone d'inhibition observées pour les souches sont dues à la composition de la paroi cellulaire bactérienne.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les extraits de plantes riches en polyphénols sont formulés dans des produits alimentaires pour des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles améliorées. L'incorporation d'extraits de plantes enrichis en composés phénoliques dans des matériaux d'emballage alimentaire constitue une approche verte prometteuse pour développer un film actif dotés d'activités antioxydants et antimicrobiennes. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail vise le développement d'un film actif à base d'amidon/ extraits de la gomme de pin d'Alep et de examiner certain comportement.

A la lumière des résultats expérimentaux obtenus, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- ✓ La méthode de l'extraction par reflux est efficace qui permet d'avoir un rendement important en composé phénolique.
- ✓ Les tests phytochimiques ont confirmé la présence des métabolites secondaires à savoir les flavonoïdes, les quinones, les coumarines les Stéroïdes et les Saponines.
- ✓ Le dosage quantitatif à révéler la richesse des extraits en polyphénols totaux, flavonoïde et les Tannins.
- ✓ Les résultats de teste diffusion des puits à confirmé l'existence d'un pouvoir antibactérien puisant des extraits vis-à-vis les souches testées
- ✓ Les testes de piégeage du radical libre par la méthode DPPH affirme que les extraits obtenus sont doté d'une forte activité antiradicalaire
- ✓ L'analyse le spectre IR à montré que le film est similaire à celui de l'extrait, ce la confirme que les composés bioactif sont incorporés avec succès dans la matrice du film.
- ✓ Les résultats du teneur d'humidité et de solubilité de film à présente une valeur acceptables.
- ✓ L'essai de l'activité antioxydant de film à présente une bonne pouvoir antioxydant.
- ✓ Les testes de l'activité antibactérienne de film, révèlent une forte inhibition vis-à-vis les souches testées.

Perspectives

Les résultats expérimentaux obtenus sont encourageants pour la poursuite de ce présent travail. Comme perspectives à réaliser dans le futur, on peut citer

- ✓ Enrichir la matrice de film bioactif par d'autres biopolymères à savoir pectine, cellulose, gélatine et du chitosane.
- ✓ Réaliser des caractérisations approfondies du film tel que DRX, MEB et RMN.
- ✓ Faire des études élargies sur les propriétés physico-chimiques et la microstructure des films.
- ✓ Effectuer des tests microbiens sur d'autres souches bactériennes.
- ✓ Améliorer cette formulation pour application dans l'emballage pharmaceutique.

Références bibliographiques

- [1] Bergo, P. V. A., Carvalho, R. A., Sobral, P. J. A., Dos Santos, R. M. C., Da Silva, F. B. R., Prizon, J. M., Solorza-Feria J. & Habitante, A. M. Q. B. (2008). Physical properties of edible films based on cassava starch as affected by the plasticizer concentration. *Packaging Technology and Science*, 21(2), 85-89.
- [2] Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841.
- [3] BeMiller, J. (2018). *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists* (3rd Edition). Woodhead Publishing and AACCI.
- [4] Gao, H.-X., He, Z., Sun, Q., He, Q., & Zeng, W.-C. (2019). A functional polysaccharide film forming by pectin, chitosan, and tea polyphenols. *Carbohydrate Polymers*, 215, 1–7.
- [5] Zhu, F. (2020). Dietary fiber polysaccharides of amaranth, buckwheat and quinoa grains: A review of chemical structure, biological functions and food uses. *Carbohydrate Polymers*, 248, 116819.
- [6] Albuquerque, P. B. S., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2017). Immobilization of bioactive compounds in Cassia grandis galactomannan-based films: Influence on physicochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 727–735
- [7] Ali, A., Chen, Y., Liu, H., Yu, L., Baloch, Z., Khalid, S., et al. (2019). Starch-based antimicrobial films functionalized by pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 1120–1126.
- [8] Salehi F. Edible Coating of Fruits and Vegetables Using Natural Gums: A Review. *Int. J. Fruit Sci.* 2020;20:S570–S589. doi: 10.1080/15538362.2020.1746730.
- [9] Yun D., He Y., Zhu H., Hui Y., Li C., Chen D., Liu J. Smart Packaging Films Based on Locust Bean Gum, Polyvinyl Alcohol, the Crude Extract of *Loropetalum Chinense* Var. *Rubrum* Petals and Its Purified Fractions. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022;205:141–153. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.068
- [10] Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45:287–306.
- [11] Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Miniñane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr.* 2008;99:12–22.
- [12] Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, flavonones, flavanones and human health: Epidemiological evidence. *J Med Food.* 2005;8:281–290.
- [13] Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:317–325.
- [14] Kühnau, J. (1976). "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition." *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191.
- [15] Macheix, J.J., Fleuriet, A & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Lausanne, Suisse. Presses polytechniques et universitaires romandes
- [16] Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63(7), 1035-1042.
- [17] Haslam, E. (1994). Natural polyphenols (vegetable tannins):GallicAcidmetabolism. *Nat.Prod.* p11, 41-66.
- [18] Pandey, K. B et Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2(5): 270 – 278.

- [19] Lacy, A. & O’Kennedy, R. (2004). Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 3797-3811.
- [20] Osbourn A., Lanzotti V. (2009). Plant-derived Naturels Products synthesis, function and application. Ed Springer, New York, 597.
- [21] Bruneton J. (1999).Pharmacognosie - Phytochimie – Plantes médicinales, 3ème Ed., Technique et Documentation, Paris. 1999, p. 227-310-312-313-314, 494 .
- [22] Bruneton J (2015) Pharmacognosie (5° Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, Tec and Doc, Lavoisier, Paris. 1504pp
- [23] Guignard J. (1996). Biochimie végétale. Ed. Lavoisier, Paris. P 175-192.
- [24] Chira K., Suh J. H., Saucier C. et Teissède P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6 : 75-82.
- [25] Collin, S., Crouzet J. Polyphénols et procédés : transformation des polyphénols au travers procédés appliqué à l’agroalimentaire. Edition TEC et doc. 2011.
- [26] Rezaire, A. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse doctorat. Université des Antilles et de la Guyane. 2012.
- [27] Benayache, F. (2005). Recherch
- [60] Nahal I., 1962. Le Pin d'Alep. Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. *Annales de l'école nationale des eaux et forêts*, 19, (4) : 533- 627.
- [61] Kadik-Achoubi L., (2005). Étude phytosociologique et phytoécologique des formations à pin d’Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de l’étage bioclimatique semi-aride algérien. Thèse de Doctorat. USTHB, Alger. 341p
- [62] Quézel P. & Barbéro M., 1992. Le pin d’Alep et les espèces voisines : répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. *Forêt méditerranéenne XIII* (3) : 158-170.
- [63] Kadik B, (1987). Contribution à l’étude du pin d’Alep (*Pinus halepensis* Mill) en Algérie. *Ecologie, dendrométrie, morphologie*. Office des publications universitaires (Alger). 585p.
- [64] Bernard Prévosto,2013,Le pin d’Alep en France:17 fiches pour connaître et gérer, Éditions Quæ,160 pp.
- [65] Becker M., picad J.F., Timbel., avec la collaboration de Germain G et Navarin J., 1981. La forêt : maison et réalisation éditoriales pédagogiques, paris. 182 p.
- [66] Boutchiche F., et Boutrigue S ,2016. Caractérisation morphométrique de la chenille processionnaire (*Thaumetopoea pityocampa*) et de son hôte au niveau de la wilaya de Tlemcen. Mémoire master en génétique. Univ Abou Bekr Belkaid Tlemcen., p (12-15).
- [67] FARJON, A. (1996). Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and palaeo-endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121(4), 365-384
- [68] Nahal, I. (1986). Taxonomie et aire géographique des pins du groupe *halepensis*. In : options méditerranéennes, Série Etude Ciheam 86/1. Le pin d’Alep et le pin brutia dans la sylviculture méditerranéenne ,1-9 p.
- [69] Quézel, P. (2000). Taxonomy and biogeography of Mediterranean pines (*Pinus halepensis* and *Pinus brutia*). In: *Ecology, Biogeography and Management of Pinus halepensis and P. Brutia Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin*. Eds., Néeman G., Trabauds L., Backhuys Publishers, Leiden,pp. 1-12.
- [70] Ammari, Y., Sghaier, T., Khaldi, A., Garchi, S. (2001). Productivité du pin d’Alep en Tunisie: Table de Production. *Annales de l’Ingref N° Special*, 239-246

- [71] Brochiero, F., Chandiooux, O., Ripert, C., Vennetier, M. (1999). Autécologie et croissance du pin d'Alep en Provence calcaire. *Forêt Méditerranéenne*, 20(2): 215-224.
- [72] Parde, J. (1957). La productivité des forêts de pin d'Alep en France. *Ann., E.N.E.F etb S.R.E.*, 15 (2): 367-414.
- [73] Haffane, M. (1982). Contribution à l'étude du comportement de *Pinus halepensis* dans les reboisements de Zoumi Mokrissat. Mémoire 3 cycle, I.A.V. Hassan II, Rabat.
- [74] Lazrec, F., 2015. Importance de la fonte de semis du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) dans le Nord-Ouest Algérien: Identification morphologique et moléculaire des espèces du genre *Fusarium* et *Glob Sporangium*, pouvoir pathogène et moyens de lutte, *Agroforesterie*. Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen, p. 187.
- [75] Lakreb, N., Sen, U., Bezzazi, B., & Pereira, H. (2022). The physicomechanical and thermal properties of Algerian Aleppo pine (*Pinus halepensis*) wood as a component of sandwich panels. *iForest – Biogeosciences and Forestry*, 15(2), 106-111.
- [76] Modugno, F., Ribechini, E., & Colombini, M.P. (2006). Aromatic resin characterization by gas chromatography-mass spectrometry: Raw and archaeological materials. *Journal of Chromatography*. 85 : 164-173.
- [77] Langenheim, J.H. (2003). *Plant Resins – Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany*. Edition p. 24-24.
- [78] Ghanmi, M., Satrani, B., Chaouch, A., Aafi, A., Abid, A.E., Ismaili, M.R., Farah, A., (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica* 154, 293–300. <https://doi.org/10.1080/12538078.2007.10516058>
- [79] Rodríguez-García, A., López, R., Martín, J.A., Pinillos, F., Gil, L. (2014). Resin yield in *Pinus pinaster* is related to tree dendrometry, stand density and tapping-induced systemic changes in xylem anatomy. *Forest Ecology and Management* 313, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.10.038>.
- [80] Verma, V.P.S., Pant, S.P. (1978). Performance of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) vis-avis chirpine (*Pinus roxburghii* Sargent) in respect of oleoresin yield at Dehra Dun. *Indian forester*.
- [81] Rodrigues, K.C.S., Fett-Neto, A.G. (2009). Oleoresin yield of *Pinus elliottii* in a subtropical climate: Seasonal variation and effect of auxin and salicylic acid-based stimulant paste. *Industrial Crops and Products* 30, 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.06.004>
- [82] Fancès, M. (2019). Eude de la mise au point d'un vernis industriel à base de colophane et d'huile végétale. Thèse doctorat : Polymères. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 21-25 p.
- [83] Holiste. (2017). Biogemme is innovating the way pine resin is collected. *Holiste Laboratoire et Développement*.
- [84] Bernard-Dagan, C. (1988). Les substances de réserve du Pin maritime: Rôle éventuel des métabolites secondaires. *Bulletin de la Société Botanique de France .Actualités Botaniques* 135, 2540. <https://doi.org/10.1080/01811789.1988.10826883>.
- [85] Kızıllarslan, C., Sevgi, E. (2013). Ethnobotanical uses of genus *Pinus* L. (Pinaceae) in Turkey. *Indian J Tradit Knowle*.12, p. 209 -220.
- [86] Boulâacheb, N. (2010). La résine de *pinus halepensis* Mill. Usage traditionnel par la Population de la petite kabylie (algerie, nord afrique). *Acta Horticulturae. International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*.853: 435-438.
- [87] Prasad.A.,Kumar, A ,& Gajrani, K.K.(Eds.). (2022). *Biodegradable Composites for Packaging Applications*. CRC Press.

- [88] Salgado, P.R., Di Giorgio, L., Musso, Y.S., & Mauri, A.N. (2019). Bioactive packaging: Combining nanotechnologies with packaging for improved food functionality. In López Rubio, A., Fabra Rovira, M.J., Martínez Sanz, M., & Gómez-Mascaraque, L.G. (Eds.), *Nanomaterials for food applications* (pp.233-270). Amsterdam: Elsevier.
- [89] Yemenicioğlu, A. (2022). *Edible Food Packaging with Natural Hydrocolloids and Active Agents*. CRC Press.
- [90] Kontominas, M. (Ed.). (2015). *Bioactive Food Packaging: Strategies, Quality, and Safety*. DEStech Publications, Inc.
- [91] Hemavathi, A.B., & Siddaramaiah, H. (2018). Food packaging: polymers as packaging materials in food supply chains. In *Encyclopedia of polymer applications*, CRC Press, Boca Raton, pp. 1374-1397.
- [92] Crini, G., Badot, P.M., Roberts, G.A., & Guibal, E. (2009). *Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application*. Presses Universitaires Franche-Comté.
- [93] Gomaa, A.M.A., Abdel Salam, H.M. (2023). *Handbook of Biodegradable Materials*, Germany: Springer Nature.
- [94] Lin, P.-C., et al., *Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials*. 2014. 32(4): p. 711-726 .
- [95] Firdouse S, Alam P (2011) Phytochemical investigation of extract of *Amorphophallus campanulatus* tubers. *International Journal of Phytochemistry* 3: 32-35.
- [96] Sangeetha R, Jayaprakash A (2015) Phytochemical Screening of *Punica granatum* Linn. Peel Extracts. *Journal of Academic and Industrial Research* 4: 160-162.
- [97] Ciulci, 1994, *Methodology for the analysis of vegetable drugs*. Chemical industries branch, division of industrial operations. UNIDO, Romania; 24, 26 and 67
- [98] Qnais E.Y., Elokda A.S., Abu Ghalyun Y.Y., Abdulla F.A., 2007. Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of *Punica granatum* (Pomegranate) Peels. *Pharmaceutical Biology*, vol 45, no 9, p.715–720.
- [99] Hajoori M., Naik M., Naik K., Desai Bhagwan S., 2014. Evaluation of antimicrobial activity of *Punica granatum* peel extracts using different solvent system, *International journal of Pharmacological Screening Methods*, vol 4, no 1, p. 26-31.
- [100] Hossain MA, Al-Raqmi KAS, Al-Mijizy ZH, Weli AM, Al-Riyami Q (2013) Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3: 705-710.
- [101] Chonoko UG, Rufai AB: Phytochemical screening and antibacterial activity of *Cucurbitapepo* against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* 2011; 4: 145-147.
- [102] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* 97, 654.
- [103] Singleton, V.L., Joseph, A., Rossi, J.R., 1965. Colorometry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-153
- [104] Djeridane A., Yousfi M., Boubekeur N., et Boutassouna D. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing Phenolic compound. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660p.
- [105] Bajorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C., et Pinkas M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Journal Article* .46(11):1086-1089p.

- [106] CB Singh, MC Devi, DS Thokchom, Sengupta M, AK Singh, Phytochemical screening, estimation of total phenols, total flavonoids and determination of antioxidant activity in the methanol extract of *Dendrobium denudans* D. Don stems ; *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2015; 4(4):06-11
- [107] Julkunen-Titto R., (1985) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (33), p:213.
- [108] Madhav Poudel and Meena Rajbhandari , *Phytochemical Analysis of Ampelopsis Prolifera (Retzius) Copeland ; Nepal Journal of Science and Technology ; (NJST) (2020), 19(1) : 78-88.*
- [109] Knežević, S.V., Blažković, B., Štefan, M.B., Alegro, A., Kőszeg, T & Petrik, J. (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules*, 16(2), 14454-1470
- [110] Afonso, C.A.M., Candeias, N.R., Simao, D.P., Trindade, A.F., Coelho, J.A.S., Tan, B & Franzen, R. (2016). *Comprehensive organic chemistry experiments for the laboratory classroom*. Cambridge, United Kingdom: Royal Society of Chemistry.
- [111] Endo, T., Fukunaga, T., Yoshimura, T., Esumi, K. (2006). Scavenging DPPH radicals catalyzed by binary noble metal–dendrimer nanocomposites. *Journal of Colloid and Interface Science*, 302(2): 516-521.
- [112] Turkmen N, Sari F et Velioglu YS. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 99 (4), 835-841.
- [113] Lapornik B, Prošek M et Wondra AG. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*. 71, 214-222.
- [114] Cacace JE et Mazza G. (2002). Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et d'autres composés phénoliques du cassis. *Institut national de Technologie agricole*. Canada pp1-16.
- [115] Bozin B., Mimica-Dukic N. et Samojlik I. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*., 111:925–929.
- [116] Jayaprakasha, G.K., Girenavar, B. and Patil, B.S. (2008). Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges : Extraction efficiency of solvents in sequence. *Food Science and Technology*. 41 :376-384.
- [117] Kil, H.Y., Seong, E.S., Ghimire, B.K., Chung, I.M., Kwon, S.S., Goh, E.J., Heo, K., Kim, M.J., Lim, J.D., Lee, D., Yu, C.Y. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem*. 115:1234-1239.
- [118] Marjorie Murphy Cowan. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*., (1999), vol. 12, n°4, p.564- 582.
- [119] Mathew, S., Brahmakumar, M., & Abraham, T. (2006). Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films. *Biopolymers*, 82, 176–187
- [120] De Menezes Filho, A.C.P., Taques, A.S., Alves, I., Ventura, M.V.A., Batista-Ventura, H.R.F., de Sousa, W.C., De Souza Castro, C.F., Teixeira, M.B., & Soares, F.A.L. (2022). Development and evaluation of biodegradable packaging from the aryl of the fruit of *Hymenaea stigonocarpa*. *Revista de Agricultura Neotropical*, vol.9 (1), pp. 1-8.

Résumé : L'objectif de ce travail vise le développement un film actif à base de mélange amidon/ gomme de pin d'Alep. La présente étude se concentre, dans un premier temps, à l'extraction des principes actifs de la gomme, suivi par des tests phytochimiques et dosage des polyphénols. Les résultats obtenus ont montré un rendement représentatif et l'analyse photochimique a révélé la richesse des extraits de la gomme en métabolites secondaires. La deuxième partie à été consacrée à l'élaboration d'un film amidon/ polyphénols suivis par des essais de humidité, solubilité et l'évaluation de leur activité biologique. Les résultats ont révélé que le film présente une activité antioxydant satisfaisante et un effet antimicrobien important contre les bactéries sélectionnées.

Mots-clés: amidon, bacteries ,extrait, gomme , pin d'Alep

Summary: The objective of this work is to develop an active film based on a mixture of starch and Aleppo pine gum. This study focuses, firstly, on the extraction of active ingredients from the gum, followed by phytochemical tests and polyphenol dosage. The results obtained showed a representative yield and the photochemical analysis revealed the richness of the gum extracts in secondary metabolites. The second part was devoted to the development of a starch/polyphenol film followed by humidity and solubility tests and the evaluation of their biological activity. The results revealed that the film has a satisfactory antioxidant activity and a significant antimicrobial effect against selected bacteria..

Key words: starch, bacteria, extract, gum, Aleppo pine

ملخص: لهدف من هذا العمل هو تطوير فيلم فعال يعتمد على خليط من النشا و صمغ الصنوبر الحلبي . تركزت هذه الدراسة في المقام الأول على استخلاص المكونات النشطة من الصمغ، تليها الاختبارات الكيميائية النباتية وجرعات البوليفينول . أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها عائدًا تمثي لياً وكشف التحليل الكيميائي الضوئي عن ثراء مستخلصات الصمغ بالمنتجات الأيضية الثانوية . أما الجزء الثاني فقد خصص لتطوير فيلم النشا /البوليفينول متنوعًا باختبارات الرطوبة والذوبان وتقييم نشاطها البيولوجي . وأظهرت النتائج أن الفيلم يظهر نشاطاً مضاداً للأوكسدة مرض ياً وتأثيراً مضاداً للميكروبات ضد البكتيريا المختارة.

الكلمات المفتاحية: النشا، البكتيريا، المستخلص، الصمغ، الصنوبر الحلبي