

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun–Tiaret
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Génétique moléculaire et amélioration des plantes

Présenté par :

M^{lle}: CHAMI Zineb

M^{lle}: HABIS Fatima

M^{lle}: HAMEURLAINE Loubna

Thème :

Etude de l'effet de l'altitude sur l'activité antimicrobienne des substances naturelles du pin d'Alep (*Pinus halepensis Mill.*) dans la région de l'Ouarsenis

Soutenu publiquement le 01 Juillet 2018

Jury:

Président: M^{lle}. BOUAZZA K.

Encadreur: M^{me}. DAHLIA F.

Co-encadreur: M^{lle} BEROUAGUI S.

Examineur: M^r LAHOUAL N.

Année universitaire 2017– 2018

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH Le Tout Puissant qui nous a donné la volonté et la santé pour mener à terme ce travail... laka al hamd rabbi

Nos remerciements les plus vifs à notre promotrice M^{me} DAHLIA F. et aussi à notre co-promotrice M^{lle} BEROUAGUI S. qui ont bien voulu assurer notre encadrement, c'est un très grand honneur pour nous qu'elles aient accepté d'être nos directrices de mémoire. Nous leur devons une immense reconnaissance et un très grand respect,

Nous remercions M^{lle} BOUAZZA K. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Nos vives gratitude vont aussi à Mr LAHOUAL N. de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Nos profonds remerciements vont également aux ingénieurs des laboratoires de biochimie et de microbiologie.

À toute personne ayant collaboré à la réalisation de ce travail.

Enfin à tous nos collègues et nos amis pour leur soutien moral.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leur

soutien et leurs sacrifices

Mes grands-parents qui m'ont accompagné avec leurs prières

Mes Oncles, pour se tenir à côté de moi tout le temps

Mon chère professeur Naïma qui m'a considéré comme sa fille et ne

m'a pas oublié dans sa prière

Mon seul frère et Mes sœurs pour leur présence à côté de moi,

Fatima

Dédicace

Je dédie ce travail à :

À ma très chère mère Safia pour sa patience son aide et ses

encouragements tout au long de mes études

À mon père Khaled

À mes sœurs : Djahida et Hadjer

À mes frères : Abed El kader, Oussama, Aymen, Alaa , Adnane,

Mohamed, Yousef et Khalouda

À mes camarades : Saliha, Siham, Hayet, et Hadjer

Loubna

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que

je dédie ce travail :

À ma mère ; à ma mère ; à ma mère

À mon très cher père

À mon seul cher frère AMIR

À mes adorables sœurs Amina et Malak

À toute ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Zineb

Liste des abréviations

DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane

HCH: Hexachlorocyclohexane

GPS: Global Positioning System

DMSO: Diméthylsulfoxyde

PDA : Potato dextrose agar

Liste des figures

Figure 1 : Description morphologique du pin d'Alep	5
Figure 2 : Exemple de distribution de pin d'Alep en Algérie (Cas de l'Ouarsenis).	6
Figure 3 : Reproduction de pin d'Alep	8
Figure 4 : Morphologie bactérienne	9
Figure 5 : Situation géographique de la wilaya de Tissemsilt	15
Figure 6 : Localisation des zones prospectées	16
Figure 7 : Exemple d'une zone de prospection (Sidi El Ghoul)	16
Figure 8 : La résine de pin d'Alep	17
Figure 9 : Les feuilles de pin d'Alep	17
Figure 10 : Exemple d'un symptôme causé par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pourriture molle de la laitue)	18
Figure 11 : Exemple d'un symptôme causé par <i>Erwinia carotovora</i> (Jambe noire de la pomme de terre (sur plant et sur tubercule)	19
Figure 12 : Fusarium de blé sur épis (a) et sur graines (b)	20
Figure 13 : Fusarium de tomate	20
Figure 14 : Diagramme du protocole expérimental	21
Figure 15 : L'hydro-distillateur (appareil d'extraction des huiles essentielles).	22
Figure 16 : Quelques étapes de la macération des extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep.	23
Figure 17 : Disposition des disques dans les boîtes de pétries	27
Figure 18 : Quelques étapes du test antifongique.	29
Figure 19 : Variations des rendements en huiles essentielles, des aiguilles de pin d'Alep, en fonction de l'altitude.	30
Figure 20 : Variations des teneurs en polyphénols totaux des aiguilles de pin d'Alep, en fonction de l'altitude	31
Figure 21 : Variations des teneurs en flavonoïdes des aiguilles de pin d'Alep, en fonction de l'altitude	32
Figure 22 : Variations des teneurs en tanin condensé des aiguilles de pin d'Alep, en fonction de l'altitude	34
Figure 23 : Variations des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différentes substances bioactives en fonction de l'altitude.	35

Figure 24 : Variations des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique **37**
par les différentes substances bioactives en fonction de l'altitude.

Liste des tableaux

Tableau1: Coordonnées géographiques des zones d'échantillonnage	15
Tableau 2 : Analyse de la variance de la teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep.	31
Tableau 3 : Analyse de la variance de la teneur en flavonoïdes des extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep	32
Tableau 4 : Analyse de la variance de la teneur en tanin condensé des extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep.	33
Tableau 5 : Analyse de la variance de l'activité antibactérienne des substances bioactives du pin d'Alep.	34
Tableau 6 : Analyse de la variance de l'activité antifongique des substances bioactives du pin d'Alep.	36

Table des matières

Titres	Pag e
Dédicaces	
Remerciement	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	2
Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Le pin d'Alep	3
Partie 1 : Le pin d'Alep : <i>Pinus halpensis</i> Mill.	3
1.1. Généralité	4
1.2. description botanique	5
1.3. biogéographie et répartition	6
1.3.1. dans le monde	6
1.3.2. en Algérie	6
1.4. l'intérêt et l'utilisation de pin d'Alep	7
1.5. cycle de vie de pin d'Alep	8
partie 2 : bactérie et champignon phytopathogènes	9
2.1. les bactéries	9
2.1.1. généralité	9
2.1.2. description	10
2.1.3. classification	10
2.1.4. reproduction	10
2.1.5. mécanisme d'attaque	10
2.2. champignons	10

2.2.1. description	10
2.2.2. reproduction	11
2.2.3. mécanisme d'attaque	11
Partie 3 : les méthodes de lutte	11
3.1. la lutte naturelle des plantes (mécanisme de défense)	11
3.2. la lutte chimique	12
3.3. la lutte physique	12
3.4. la lutte intégrée	12
3.5. la lutte biologique	12
Chapitre 2 : la zone d'étude	
1. Situation géographique	15
2. Le climat	16
Chapitre 3 : matériel et méthode	17
1. Matériel biologique	17
1.1. Le Matériel végétale	17
1.2. Le Matériel microbiologique	18
1.2.1. Les souches bactériennes	19
1.2.2. Les souches fongiques	20
2. La méthodologie de travail	21
2.1.Préparation des bioactifs	21
2.1.1. Extraction des huiles essentielles	21
2.1.2. Préparation des extraits aqueux	22
2.2. Détermination des propriétés biochimiques	23
2.2.1. Dosage des composés phénoliques totaux	23
2.2.2. Dosage des flavonoïdes	24
2.2.3. Dosage des tanins condensés	25
2.3.Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne des bioactif du pin d'Alep	25
2.3.1. Activité antibactérienne	25
2.3.1.1.Préparation des milieux de culture	

2.3.1.2. Préparation de pré culture	26
2.3.1.3.Effet des bios actifs du pin d'Alep sur les germes phytopathogènes	26
2.3.2. Activité antifongique	27
3.3.2.1. préparation de milieu de culture	28
3.3.2.2. purification des souches	28
3.3.2.3. teste antifongique	28
3. Analyse statistique	29
Chapitre 4 : Résultat et discussion	
1. Résultat	30
1.1. Détermination du rendement d'huiles essentielles	30
1.2. Analyse quantitative des composées phénoliques des extraits aqueux	30
1.2.1. Teneurs en polyphénols totaux	32
1.2.2. Teneurs en flavonoïdes	33
1.2.3. Teneurs en tanins condensés	34
1.3. Activité antimicrobienne	34
1.3.1. Activité antibactérienne	36
1.3.2. L'activité antifongique	
Conclusion	
Référence bibliographique	
Résumé	

Introduction

Introduction

L'agriculture mondiale est aujourd'hui frappée par un courant qui favorise des pratiques plus durables et plus respectueuses de l'environnement. Pour répondre à ces nouvelles exigences, les agriculteurs doivent se tourner vers l'exploitation et la rentabilisation des ressources naturelles par le biais de pratiques agricoles combinant la performance et la protection des cultures à un moindre coût écologique. Dans ce contexte, le développement de molécules biologiques capables de stimuler les défenses naturelles des végétaux est une stratégie qui attire de plus en plus l'attention. **(Benhamou et Rey, 2012).**

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires appartenant à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) qui sont très inégalement répartis chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevées, ils sont utilisées dans de nombreux domaines : pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire **(Macheix et al, 2005)**. L'homme les utilise entre autres comme arômes, colorants, additifs alimentaires et comme matières actives dans de nombreux médicaments **(Bouque, 1997)**.

Dans tous les pays, les pins sont synonymes de richesse pour les populations. Ils apportent des ressources en nourriture (graines). Des essences pour les parfumeries et la chimie, du bois d'œuvre et de bois industries **(ANSEL, 2003)**.

Les pins du groupe "halpensis" comme les autres essences, ont tendance à occuper certaines ceintures altitudinales correspondant à des étages de végétation, et bien entendu à des ensembles bioclimatiques, qui se retrouvent sur tout le pourtour de la Méditerranée **(Quezel et Barbero, 1992)**.

Donc y'a t'il un effet de l'altitude sur le pin d'Alep et son métabolisme secondaire?

Dans ce cadre, le travail que nous avons réalisé est dans le but d'évaluer l'effet de l'altitude sur les métabolismes secondaire du *Pinus halepensis* à travers l'étude de quelques activités biologiques (antifongique et antibactérienne).

Ce mémoire est réalisé en deux parties :

- Une première partie consiste en une étude bibliographique sur le pin d'Alep

- La deuxième partie consiste à l'étude expérimentale. Au cours de cette partie, nous visons de la préparation des bioactifs (l'extraction des huiles essentielles de Pin d'Alep, les extraits aqueux et la résine). Cette étape est suivie par une évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de ces bioactifs et la détermination de ces propriétés biochimiques.

Chapitre 1 :
Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Partie 1 : Le Pin d'Alep : *Pinus halepensis* Mill.

1.1. Généralités

Le Pin fut décrit pour la première fois par Duiamel, en 1755, sous le nom de *Pinoshiero soliviitana* Duham. Miller l'a redécrit plus tard, en 1768, sous le nom de *Pinus halepensis* Mill. Plus tard, il fut décrit par différents auteurs dans la région méditerranéenne et a reçu des noms divers. Il semble que l'appellation valable pour le Pin d'Alep soit celle qui fut donnée - par Miller en 1768 (*P. halepensis* Mill.), et c'est elle qui fut retenue par tous les botanistes. Il est intéressant de signaler que ce Pin n'existe pas à l'état naturel dans la région d'Alep en Syrie Le Pin qu'on trouve à l'état naturel dans cette région est un Pin voisin, appelé *Pinos brutia*, et qui constitue les Pineraies du Kurd Dagh. Les Pins que Miller a décrits doivent être d'origine artificielle: les graines furent importées, vraisemblablement des pays voisins (Liban, Palestine, Jordanie) (Nahal, 1962).

1.2. Systématique du pin d'Alep

La systématique de pin d'Alep reçu par Farjon (1996) résume comme suit :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphyta

Sous-embranchement : Gymnospermae

Classe : Pinopsida

Ordre : Abiétales

Famille : Pinaceae (Abietaceae)

Sous-famille : Pinoïdeae

Genre : *Pinus*

Sous-genre : *Eupinus*

Espèce : *Pinus halepensis* Mill

1.3. Description botanique du pin d'Alep

Ce sont le plus souvent des arbres de taille moyenne dépassant exceptionnellement les 30 mètres, avec des cônes isolé, rarement par paire ou verticillés, pédoncule et réfléchi vers la base du rameau :(**Debazac et Tomassne, 1965**).

Les aiguilles sont molles, très finement serullées sur les bords, de 5 à 10 cm de long. Elles sont réunies par deux, rarement par trois dans une même graine, Elles sont groupées en générale en pinceau à l'extrémité des rameaux. Les aiguilles sont de couleur vert-jaunâtre (figure 1 c). Ces aiguilles donnent à la couronne de l'arbre un aspect clairsemé de couleur vert jaunâtre (**Nahal, 1992**).

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 (**Becker et al. 1981**).

Les graines sont brune d'un côté, gris ponctués de noir de l'autre, avec une aile claire quatre fois plus long que la graine (figure 1 e) (**Huchon, 1956**).

Les jeunes sujets ont une écorce lisse, gris argenté. A l'âge adulte, ils ont un rhytidome plus ou moins gerçure en écailles mince, large aplaties et de couleur rougeâtre. Avec le temps, l'écorce devient fortement crevassée et s'épaissit ; l'épaisseur d'épand de la zone géographique (**Kadik, 1986**).

Le bois de pin d'Alep est léger et faiblement à moyennement résistant (**Derbal et al. 2015**). La résine, est un liquide limpide, jaune à brun qui durcit et brunit en séchant (**Heitz, 2016**).



(a)

(b)

(c)



Figure 1 : Description morphologique du pin d'Alep : (a) arbre, (b) cônes, (c) aiguilles , (d) chatons (e) graines et (f) écorce.

Sources :

- a) Photo originale prise en janvier 2018
- b) grand site saintevictoir.com
- c) bio-tunisia innovation
- d) <http://biologie.enslyon.fr/ressources/Biodiversité/Documents/image-de-la-semaine/2011/semaine-44-31-10-2011/>
- e) radionational.th
- f) visoflora.com

1.4. Biogéographie et répartition du pin d'Alep

1.4.1. Dans le monde

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) est un des arbres les plus communs dans la partie ouest du bassin méditerranéen, où il occupe environ 3,5 millions d'hectares (Vennetier et al., 2011). Il possède l'amplitude écologique la plus vaste (Sghaier, Ammari, 2012).

En Espagne, le pin d'Alep existe dans la partie méditerranéenne de la péninsule ainsi qu'aux Iles Baléares (Debazac et Tomassone, 1965). En Italie, il couvre une superficie de 20.000 ha environ notamment dans le sud et en de rares localités de Sicile et de Sardaigne. (Quezel et Barbero, 1992). En France, l'inventaire forestier national lui attribuait 244.000 ha en 2003 dont 208.000 ha dans la région Provence-Alpes-Côte d'Azur (Vennetier et al. 2010).

Au Proche-Orient, le pin d'Alep n'est certainement présent en Turquie qu'au Nord-est d'Adana. En Syrie il constitue quelques peuplements sur le revers occidental de la chaîne des Alaouites. Il constitue en outre quelques boisements relativement importants en Palestine et en Jordanie (Alaoui, 2011).

En Afrique du Nord, le pin d'Alep est plus développé puisqu'il apparaît à peu près partout sur les massifs montagneux. Il s'étend sur une superficie de 1.260.000 ha (**Boudy, 1950**). Au Maroc, il est relativement rare. Sa distribution est très disloquée. Il couvre une superficie de 65.000 ha environ, répartie sur le versant méditerranéen au niveau du Maroc Oriental, du Rif Oriental, du Moyen Atlas, des montagnes de Debdou, de la presqu'île de Melilia, le Grand Atlas oriental et au Sud-est de la Moulouya (**Emberger, 1939**). En Tunisie, le pin d'Alep est présent sous différents étages bioclimatiques depuis l'aride supérieur jusqu'à l'humide avec des variantes thermiques chaudes, douces et tempérées, son optimum de croissance étant enregistré dans le semi-aride à hivers frais (**Sghaier et Claustrioux, 2014**).

1.4.2. En Algérie

Le pin d'Alep se trouve essentiellement en Oranie (Sidi-Bel-Abbès, Saida, Tlemcen, Ouarsenis (figure 2)), sur le Tell algérois (Médéa, Bidans) et sur l'Atlas saharien (Amont de Ouled Nails) où occupe une surface de 200.000 ha (**Alaoui et al, 2011**).

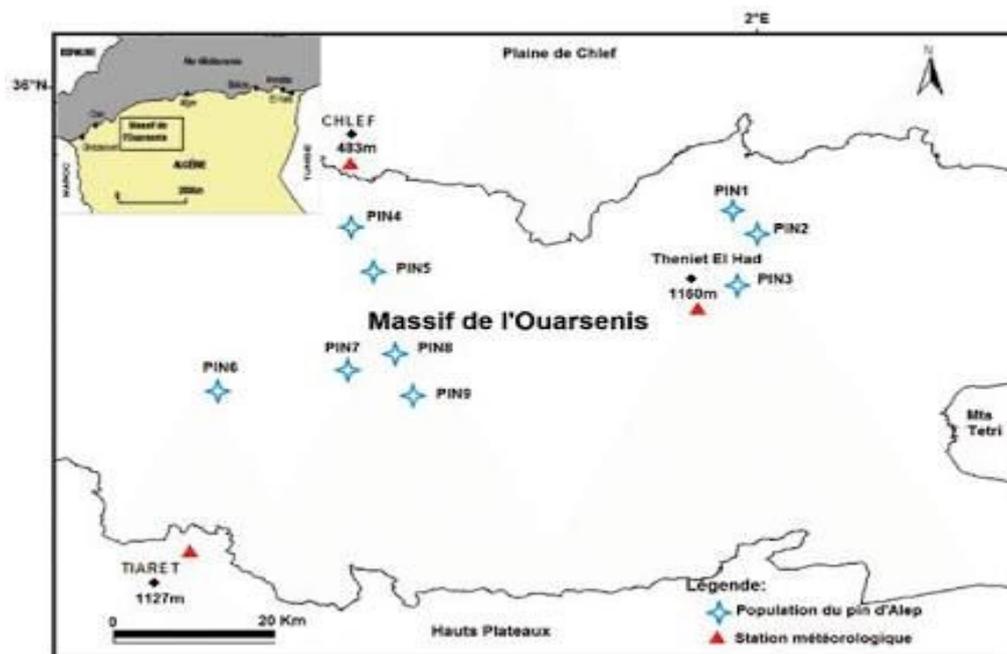


Figure 2 : distribution de pin d'Alep en Algérie (Cas de l'Ouarsenis)

Source : [researchgate.net](https://www.researchgate.net)

1.5. Intérêt et l'utilisation de pin d'Alep

Le pin d'Alep se révèle dans certains cas, un producteur de bois plus qu'honorable (**Morel et, 1987**). Les pins sont utilisés dans la construction navale, et leurs fruits sont mangés après avoir cassé leurs coquilles. A l'époque, ils ont été utilisés pour la fabrication d'une

farine de pain. L'huile de ses grains est utilisée dans les industries, et dans le nettoyage de la peau. (Ahmed, 2006).

Avant J.-C.: pin d'Alep majoritairement utilisé pour la confection des pieux, poutres et rouleaux; quai et appontement composés d'une centaine de pieux de pin d'Alep non équarris (Vauvenargues et Sainte-Victoria, 2011).

Le pin d'Alep joue un très grand rôle dans le reboisement. A l'état naturel, il colonise pratiquement la plupart de la zone subhumide et semi-aride, il est cependant largement utilisé dans des stations les plus divers. La surface qui lui est consacré chaque année dans les reboisements dépassent 20000hectars soit environ 40.000.000 de plante mis en terre. (Kadik, 1986).

1.6. Cycle de vie de pin d'Alep

Le polycyclisme est la formation d'unités de croissance successives au cours de la même année de végétation et dont l'ensemble constitue la pousse annuelle. Les rameaux vigoureux de pin d'Alep sont toujours polycycliques au printemps (2 à 3 cycles). Lorsque le climat est favorable, en fin d'été, un nouveau cycle peut apparaître en automne. On reconnaît l'amorce de la pousse annuelle grâce à la présence d'écailles serrées. La limite entre ces pousses est marquée par des écailles stériles (cataphylles) espacées. Avec ce changement climatique (hivers doux), les pousses prévues pour le printemps peuvent démarrer en automne. Par conséquent, les cônes peuvent être portés par ces pousses, et les écailles serrées se retrouver à leur base et non à celle de la première pousse de printemps (Prévosto, 2013).

Les conifères, et le pin en particulier sont monoïques c'est-à-dire que tous les arbres produisent les organes de deux sexes ; les organes mâles sont formés de petits cônes staminaux, groupés à la base des pousses de l'année. Les cônes femelles naissent à l'extrémité des pousses mais leur développement est lent et il leur faut deux ans pour se transformer en « pomme de pin » mures laissant échapper les graines (figure 3). Chaque cône mâle est formé de plusieurs rangers d'écailles dans chacune porte à sa face inférieure de sac pollinique souvent par une fente longitudinale (Ozenda, 2002)

Les graines de pollen sont dispersés par le vent : pollinisation anémophile il s'atteignent les cônes femelles, s'insinuent dans les interstices des écailles, arrive au contact des ovules, sont retenus par une substance mucilagineuse excrétée par le sommet de l'ovule et germe : le prothalle subit de nouvelle division (cellule de tube, cellule socle, cellule reproductrice qui donnent naissance à deux anthérozoïdes dépourvus de cils est appelée

gamète) puis émet un diverticule ou tube pollinique, formé aux dépens de l'intine qui traverse les tissus de l'ovule et pénètre dans le col de l'archégone ; l'extrémité du tube pollinique se rompt et le gamète plus proche féconde l'oosphère tandis que l'autre dégénère. Deux ou trois oosphères sont ainsi fécondés mais finalement un seul embryon se développe et croît au dépend de tissu de l'endosperme qui l'entourent : l'embryon n'est ainsi à aucun moment en contact avec le milieu extérieur (**Guignard, 1994**).

Les couches protectrices de l'embryon s'épaississent ; l'embryon et l'endosperme se déshydratent et entrent en vie ralentie : l'ovule devient une graine qui est libérée lors de l'ouverture du cône femelle (transport par le vent grâce à son aileron : anémochorie). La graine germe quand les conditions sont favorables, parfois seulement la 3^e année (**Jean, 2015**).



Figure 3 : La reproduction de pin d'Alep

Source : www.afleurdepau.com

Partie 2 : Bactéries et champignons phytopathogènes

De tout temps, les plantes cultivées par l'homme furent atteintes de maladies (viroses, bactérioses et mycoses) ou la proie de ravageurs (insectes, oiseaux, mammifères rongeurs) (**Gorbaz, 1990**). Ils interfèrent avec une ou plusieurs fonctions biologiques des plantes. Par exemple, un insecte qui s'attaque aux feuilles réduira la capacité de la plante à mener la

photosynthèse. Un champignon pathogène, qui s'attaque aux racines, réduit l'absorption de l'eau et des minéraux (**Beudelot et al. 2017**).

2.1.bactéries

2.1.1. Généralités

Les bactéries sont des organismes composés pour la plupart d'une seule cellule. Elles mesurent environ 1 millièmètre de millimètre et sont donc invisibles à l'œil nu (figure 4). Apparues sur terre il y a environ 3,5 milliards d'années. On les retrouve partout: dans les océans, sur la terre, dans le sol au milieu des déserts comme en Antarctique (**Perron, 2010**). Les bactéries pathogènes pour les plantes sont classées en cinq genres seulement : *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* et *Xanthomonas*. Ces cinq genres sont répartis pour certains sous toutes les latitudes et causent des dégâts considérables aux cultures (**Boher, 1987**).

2.1.2. Description

Les Bactéries sont généralement des organismes unicellulaires dont la plupart ont des parois contenant le peptidoglycane, une molécule structurante. Bien que la grande majorité des bactéries aient une structure procaryotique typique caractérisée par l'absence de noyau lié à une membrane, quelques espèces du très singulier phylum *Planctomyces* ont leur matériel génétique entouré d'une membrane. Cette incohérence a fourni un argument supplémentaire à certains contre l'usage du terme procaryote et pour son abandon définitif (**Coyette et Mergeay, 2011**).

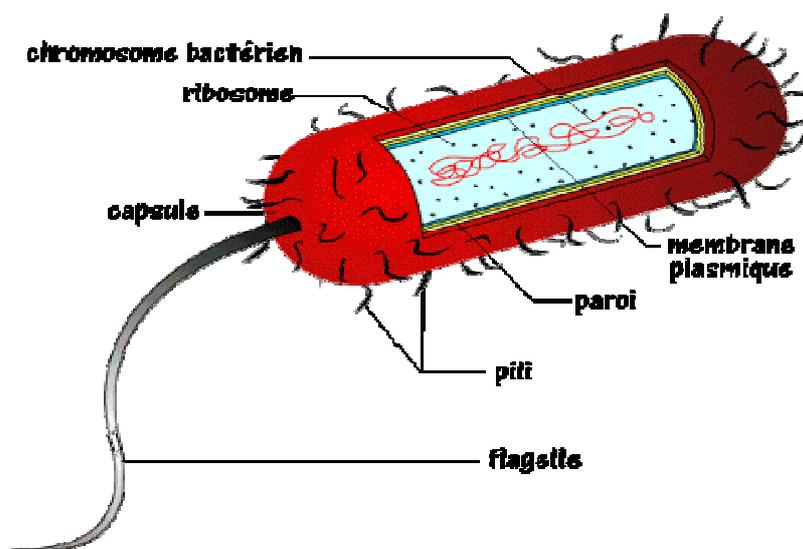


Figure 4 : Morphologie bactérienne

Source : [blog .ac-versailles.fr](http://blog.ac-versailles.fr)

2.1.3. Reproduction

Le mode de reproduction le plus fréquent chez les bactéries est la multiplication asexuée. La cellule bactérienne se divise directement donnant naissance après division des noyaux à deux cellules filles, identiques à la cellule mère. Les cellules filles peuvent rester provisoirement assemblées en colonies caractéristiques. Le rythme de ces divisions est actif (tout les 20 min) tant que le milieu est favorable, ce qui peut expliquer le caractère explosif de certaines attaques bactériennes (**Bigre et al, 1987**).

2.1.4. Mécanisme d'attaque

Les bactéries sont disséminées par le vent, la pluie, les insectes ou les pratiques culturales. Elles pénètrent dans les plantes au niveau de blessures ou d'ouvertures naturelles comme les stomates. Elles occupent le xylème ou les espaces intercellulaires de différents tissus végétaux regroupés sous le terme d'apoplasme. Pour proliférer dans leur hôte et établir la maladie, elles utilisent plusieurs stratégies de virulence comme la dégradation de la paroi végétale et la production de phytotoxines et d'exopolysaccharides (**Poueymiro, 2009**).

2.2. Champignons

2.2.1. Description

Organismes unicellulaires ou pluricellulaires dont les cellules possèdent un noyau (eucaryote), se nourrissent par absorption et utilisent le carbone organique comme source de carbone (ce sont des hétérotrophes). Leur paroi cellulaire contient typiquement de la chitine et du glucan, Ils peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée (**Dufresne, 2018**).

Les champignons parasites des végétaux sont des microorganismes dans les dimensions des spores se situent entre 10 à 100 µ, ils sont caractérisés par un mycélium formé de filaments nommés hyphes (**Corbaz, 1990**).

2.2.2. Classification

La classification générale des champignons se fonde sur les caractéristiques des thalles (plasmode nu ou filament, cloisonné ou non : présence éventuelles de cellules nu flagellées) ainsi que sur les modalités de leur reproduction sexuée. Les formes de reproduction sexuées de certains champignons étant inconnues (ou ayant été découvertes bien après la description des formes asexuées) on a groupé ces espèces dans la classe des deutéromycètes ou fungi imperfecti, subdivisée sur base des modes de reproduction asexuée (formes conidiennes) (**Semal, 1996**).

2.2.2. Reproduction

La plupart des champignons possèdent deux modalités de reproduction : la reproduction asexuée (caractéristique de l'anamorphe) et la reproduction sexuée (caractéristique du télémorphe). La reproduction asexuée produit généralement un grand nombre des spores assurant l'extension secondaire des maladies tandis que les spores sexuées constituant souvent les sources d'inoculum primaires assurant la récurrence de l'épidémie (forme de conservation).

Le cycle de reproduction sexuée comporte une étape de plasmogamie (fusion des cytoplasmes de deux gamètes) suivi d'une caryogamie (fusion des noyaux correspondant) et d'une méiose (division réductionnelle). L'importance relative de ces différentes étapes et leur localisation dans le cycle parasitaire sont très variables selon les taxons (Lepoivre, 2003)

2.2.3. Mécanismes d'attaque

Le parasitisme suppose l'existence de deux organismes : le parasite dont les actions sont offensives, spoliatrices, destructrices ou toxiques, et l'hôte dont les actions sont défensifs. Une étroite connexion entre le parasite et son hôte est toujours nécessaire. Ceci implique que le parasite est capable d'entrer dans les tissus de l'organisme aux dépens duquel il va vivre. Une fois la pénétration réalisée, le parasite se procure l'eau et les aliments soit en tuant les cellules de l'hôte et en effectuant des prélèvements dans les cellules mortes, soit en établissant des relations avec des cellules vivantes et en absorbant leurs produits solubles sans causer de nécrose, au moins pendant un temps (**Chevaugéon, 1957**).

Partie 3 : méthodes de lutte

3.1. lutte naturelle des plantes (mécanisme de défense)

Les travaux de ces dernières années ont permis d'établir une image relativement précise des événements conduisant à l'induction de résistance chez les plantes, La séquence de ces événements peut être décomposée en trois étapes majeures: reconnaissance entre les deux partenaires via des interactions de surface (ex. : lectine- sucre) et émission d'un signal. Les phénomènes de reconnaissance au niveau des surfaces cellulaires conduisent, dans la plupart des cas, à l'émission de signaux chimiques, les éliciteurs, qui se lient de façon spécifique à des récepteurs membranaires entraînant une dépolarisation instantanée de cette membrane et la

transmission du signal éliciteurs au génome de la plante via des molécules appelées des messagers secondaires (**Benhamou et Picard, 1999**).

3.1.1. lutte chimique

Malgré son efficacité, la lutte chimique a beaucoup de limites. Elle provoque l'émergence de génotypes pathogènes résistants, poussant les agriculteurs à sur-doser, à augmenter les fréquences d'utilisation parfois sans respecter les conditions d'application (stades du ravageur, traitement préventif ou curatif, délai avant récolte, etc.) et à utiliser des produits très toxiques aggravant ainsi la situation. Cette situation est néfaste aussi bien pour l'environnement que pour le budget de l'agriculteur, en plus du refoulement des fruits exportés à l'étranger suite au non-respect des doses de pesticides autorisées par les pays importateurs (**Sellamiet al. 2015**).

3.1.2. lutte physique

La lutte physique en protection des plantes et des denrées alimentaires regroupe toutes les techniques de lutte dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique, biochimique ou toxicologique. Il existe deux types fondamentaux de méthodes en lutte physique: les méthodes actives qui utilisent de l'énergie au moment de l'application pour détruire, blesser, stresser ou encore enlever les ennemis des cultures du milieu et les méthodes passives qui procèdent par une modification du milieu et ont un caractère plus durable tel que l'emploi d'emballage pour isoler les denrées alimentaires des insectes nuisibles (**Sellami et al., 2015**).

3.1.3. lutte intégrée

Le terme de lutte intégrée a été créé par des entomologistes pour désigner les essais d'harmonisation des méthodes chimiques et biologiques qu'ils avaient entrepris en Californie (**CCE, 1975**). C'est la combinaison de plusieurs méthodes de lutte dans le but de limiter le développement des bio agresseurs des cultures afin qu'ils ne provoquent pas de dégâts économiques, et ce d'une façon durable et respectueuse de l'environnement (**Ryckewaert et al. 2004**).

3.1.4. lutte biologique

Dans le préambule à ses nouveaux statuts établis en 1971, l'Organisation Internationale de Lutte Biologique contre les Animaux et les Plantes Nuisibles définit ainsi son objet qui est "*L'utilisation d'organismes vivants ou de leurs*

produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles". Cette définition très large répond au désir de tous les chercheurs engagés dans ce domaine de tirer le plus grand parti possible de toutes les possibilités offertes par le monde vivant (CCE, 1975).

La lutte biologique consiste à utilisation d'organismes vivants appelés « auxiliaires » ou « agents de lutte biologique » pour diminuer les populations et les impacts d'une espèce jugée nuisible (« bio agresseur ») (Ris, 2016). Les auxiliaires de la lutte peuvent être des arthropodes prédateurs et parasitoïdes, des nématodes, ainsi que des micro-organismes entomopathogènes, tels que les virus, champignons, ou protozoaires (Chaumard et Gagnon, 2001).

L'objectif de la lutte biologique est de remplacer, en totalité ou en partie, les pesticides chimiques utilisés en agriculture et en foresterie (Lefort, 2010).

Des producteurs utilisent le trèfle en intercalaire dans le blé pour apporter l'année suivante l'azote nécessaire à la culture du maïs grain. Conséquemment, ils ont observé une réduction des contenus en vomitoxine des grains (Vachonet al, 2011). Les agents biologiques appliqués à l'anthèse peuvent contrôler les Fusarium en stoppant, en réduisant ou en retardant la germination des spores (Fernando, 2001).

Les microorganismes utilisables en lutte biologique appartiennent à tous les groupes de microorganismes : virus, bactéries et champignons. Leurs modes d'action sont variés et complexes ; ils reposent sur l'antagonisme direct (parasitisme, compétition antibiose) et l'antagonisme indirect c'est-à-dire la capacité à induire la résistance de la plante. Bien que les recherches portant sur la lutte biologique soient anciennes, il existe peu de produits commercialisés. C'est les produits dérivés de *Bacillus thuringiensis* qui représentent la plus forte proportion des ventes (Alabouvette, 2007).

Chez les phyto-bactéries, la chimiothérapie est peu efficace ou soumise à restriction lorsque des mesures de prudence interdisent, comme en France, l'emploi des antibiotiques en agriculture. Un très bon modèle de lutte biologique a été mis au point contre *l'Agrobacterium tumefaciens* Conn, agent du crown Gall, grave maladie transmise par le sol et sévissant en pépinière et au champ sur un grand nombre de plantes ligneuses. Introduite dans la plante par une blessure du collet, la bactérie transfère dans les cellules-hôtes un plasmide T_i qui dévie le métabolisme normal et induit la tumorigénèse tissulaire. En 1972, les chercheurs découvrent la souche 84 d'*Agrobacterium Radiobacter* Conn, non pathogène, capable d'empêcher le

transfert de T_i en émettant une bactériocine (agrocine 84). Cette substance empêcherait la bactérie pathogène de reconnaître le site récepteur de l'hôte (**Ponchet, 1982**).

Certains métabolites secondaires interviennent dans la signalisation lors de la mise en place des réponses de défense. On peut citer l'exemple des phytohormones, Les terpènes sont également des molécules de signalisation qui peuvent être émises par la plante pour permettre la communication et la coordination de la mise en place des défenses entre plantes et d'attirer les parasitoïdes de certains herbivores ou insectes attaquant une plante (**Didierlaurent, 2017**).

Les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des plus récentes études sur cette activité est celle d'Orturno (2005) qui démontre l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones de *Cirtus parasidi* de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum* (**Mansour-Djaalab, 2014**).

L'action biocide d'extraits de plantes sur champignons se manifeste par l'inhibition de la sporulation ou par une réduction de la sévérité de la maladie. **Okereke et al. (2007)** ont montré que l'application des extraits aqueux d'*Azadirachta indica* A.Juss. (Meliaceae), de *Carica papaya* L. (Caricaceae) et d'*Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae) sur des plants de tomate infectés par *Sclerotium rolfsii* Saccardo permet de réduire la sévérité de la maladie et d'obtenir une meilleure croissance des plants (**Yarou et al, 2017**).

Chapitre 2 :
LA ZONE D'ETUDE

Chapitre 2 : La zone d'étude

1. Situation géographique

Contenue dans le grand massif de l'Ouarsenis (1985m), la Wilaya de Tissemsilt s'étend sur une superficie de **3151,37 Km²**. Elle est limitée (**figure 5**) au nord, par la wilaya d'Ain Defla et Chlef, à l'est, par la Wilaya de Médéa, à l'ouest, par la wilaya de Ghilizane, au sud-ouest, par la wilaya de Tiaret et au sud-est par la wilaya de Djelfa (**Bessaih, 2014**).



Figure 5 : Situation géographique de la wilaya de Tissemsilt

Source :Andi,2014

Les trois zones prospectées, El Khalwa, Guendouz et Sidi El Ghoul, sont localisées au cœur de la forêt de l'Ouarsenis, à des altitudes différentes. Le tableau N°1 et la figure N° 6 illustrent la localisation et les coordonnées géographiques des trois zones prospectées.

Tableau 1 : Coordonnées géographiques des trois zones prospectées

Symbole	zones	Altitudes	Latitudes	Longitudes
★	Sidi Elghoule	1325 m	35°,760 N	1°,763 E
★	Guendouz	1023 m	35°,752 N	1°,747 E
★	EL Khaloua	496 m	35°,780 N	1°,736 E

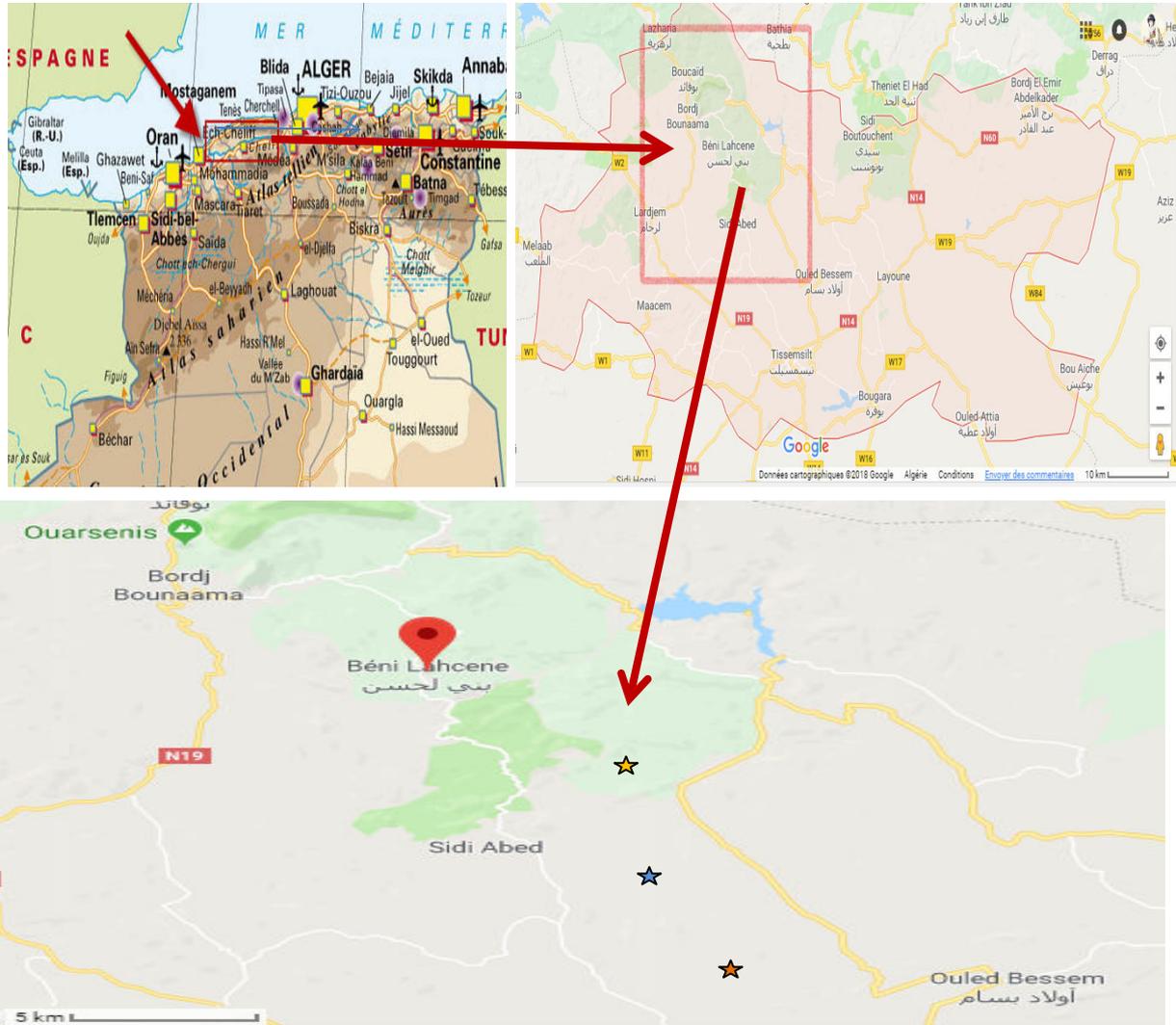


Figure 6 : Localisation des zones prospectées



Figure 7 : zone de prospection de (Sidi El Ghoul)

(Photo originale prise en janvier 2018)

2. climat

La région de Tissemsilt fait partie de l'étage bioclimatique du semi-aride, particularité du climat méditerranéen, caractérisée par un hiver froid humide et un été chaud et sec. La température moyenne hivernale est comprise entre 0° est 6 ° C et celle estivale oscille entre 32 °C et 40 °C. Quant à la pluviosité moyenne annuelle, elle oscille entre 300 et 600 mm de pluies, avec cependant un pic de 800mm enregistrée aux monts de l'Ouarsenis où on note également la chute de neige dont la hauteur moyenne qui se situe dans une fourchette comprise entre 0,5 et 50 cm d'épaisseur. Le domaine forestier couvre 20% du territoire avec une superficie de 62.119 ha (**Andi, 2013**).

Chapitre 3 :

MATERIEL ET METHOD

1. Matériel biologique

1.1.matériel végétal

Le matériel végétal étudié est les aiguilles et la résine du pin d'Alep. Les aiguilles du pin d'Alep ont été récoltées au mois de janvier 2018 et la résine a été récoltée au mois d'avril 2018. Elles ont été collectées depuis trois zones différentes de la région de l'Ouarsenis à Tissemsilt.

Les aiguilles ont été séchées à l'aire libre pendant 15 jours et la résine pendant 10 jours. Elle a été réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique. Le broyat a été tamisé à travers des tamis de différentes mailles, afin de récupérer une poudre très fine, Puis conservée soigneusement, à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'au jour de leur utilisation.



Figure 8 : La résine de pin d'Alep



Figure 9 : Les feuilles de pin d'Alep

Source : Photos originales prise en janvier 2018

1.2.matériel microbiologique

Les souches utilisées pour l'évaluation du pouvoir antimicrobien regroupent deux bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Erwinia carotovora* et deux champignons phytopathogène Fusarium de blé (*Fusarium graminearum*) et Fusarium de la tomate (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*).

1.2.1. souches bactériennes

Pseudomonas aeruginosa : se présente sous forme de bâtonnets droits de 1 à 3 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large. C'est un bacille à Gram négatif, non sporulé et rendu mobile, surtout en aérobiose, par une ciliature polaire (Lesne et al., 2004). Elle est invasive et toxigène, résistante, à l'antibiotique, capable de s'adapter à des environnements très divers en raison de sa très grande plasticité génétique (Mesaros et al., 2007). Chez les plantes, *P. aeruginosa* induit des symptômes de pourriture molle chez l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) et la laitue (*Lactuca sativa*). C'est un agent pathogène puissant. Les associations de facteurs de virulence sont les mêmes pour les infections végétales et animales (Rahme et al., 1997).

Erwinia carotovora : Ces bactéries appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et forment un groupe d'agents pathogènes des *Solanum tuberosum*. Ce sont des bacilles Gram négatif, en bâtonnets droits de 0,5 à 1,0 µm par 1,0 à 3,0 µm, anaérobies facultatives, mobiles grâce à des flagelles péritriches, isolées par paires et parfois en chaînes courtes, oxydase négative et catalase positive (Halabi, 2014). Les *Erwinia* sont responsables de nombreuses maladies de la pomme de terre. D'une part, les maladies développées au champ elles que la maladie de la jambe noire (figure 11) ainsi que des flétrissements bactériens (Dupuis et al. 2005). Les souches d'*Erwinia* ont produit l'oxydase, le catalase, le pectinase et l'indole, réduisent le saccharose, produisent l'acide à partir d'a-méthyle glucoside, utilisent le glucose en conditions anaérobiques et croissent à 36°C (Lacroix, 1994).



Figure 10 : symptôme causé par *Pseudomonas aeruginosa* (Pourriture molle de la laitue)

Source : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5936/Salades-Bacteries-foliaires>



Figure 11 : symptôme causé par *Erwinia carotovora* (Jambe noire de la pomme de terre (sur plant et sur tubercule)

Source : <http://plantdepommeeterre.org/index/jambe-noire-et-pourriture-molle>

1.2.2. souches fongiques

Les espèces du genre *Fusarium* produisent des mycotoxines très dangereuses pour la santé humaine et des animaux d'élevage dont la présence dans la récolte est aujourd'hui plus préoccupante que la perte de rendement (**Miller, 1994**).

Fusarium graminearum de l'épi chez le blé (*Triticum aestivum* L.) est une maladie fongique avec mycotoxines. Les améliorateurs n'ont pas encore réussi à associer la résistance et les qualités agronomiques dans un même génotype contre ce pathogène (**Pany et al, 1995**). Les symptômes sont très visibles sur champ car ils se manifestent par un blanchiment prématuré d'une partie ou de la totalité de l'épi (**figure 12**). Les premiers symptômes apparaissent souvent au centre de l'épi d'où ils progressent ensuite vers le haut et vers le bas (**Zillinsky, 1983 ; Wegulo et al, 2008**). Les grains mûrs peuvent être ratatinés, légers, blancs crayeux ou parfois roses, on parle alors de grains momifiés ou endommagés par le *Fusarium*. Les grains momifiés sont souvent plus lourdement contaminés par les mycotoxines (**Richard, 2004 ; Wegulo et al, 2008 ; Mathieu et al, 2012**).

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* affecte les plantes de tomate. Lors de l'infection, la vitesse de circulation de la sève était réduite de 96 à 98 %, La régulation stomatique s'avère impuissante à maintenir l'équilibre hydrique (**Declert, 1970**). Le déséquilibre du bilan des échanges d'eau est en effet une hypothèse généralement admise pour expliquer le flétrissement (figure 13) des plantes atteintes dans leur xylème (**Beckman, 1962**).



Figure 12 : Fusarium de blé sur épis (a) et sur graines (b)

Sources :

(a) <http://agronomija.rs/2013/fuzarioze-fusarium-spp-fusarium-graminearum/>

(b) <https://www.grainews.ca/2014/03/05/albertas-fusarium-action-plan/>



Figure 13 : Fusarium de Tomate

Source : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/10598/Biotel-Leg-Fusarium-oxysporum-f-sp-lycopersici>

2. méthodologie de travail

Les essais expérimentaux sont réalisés pendant la durée allant du 5 février 2018 au 20 mai 2018. Ils ont été réalisés au niveau des laboratoires de microbiologie, de physiologie végétale et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Le diagramme ci-dessous résume le protocole expérimental suivi :

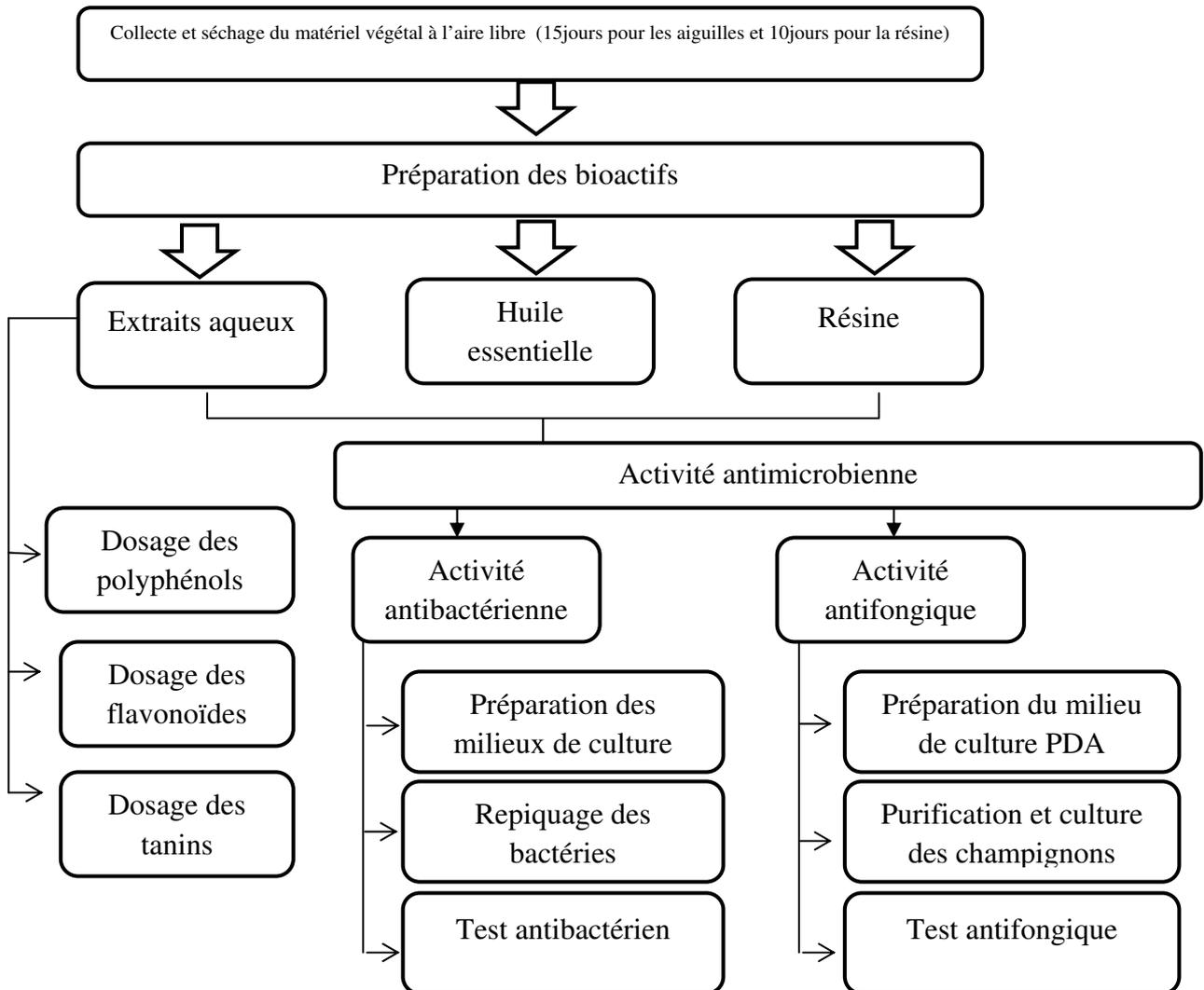


Figure 14 : Organigramme du protocole expérimental

2.1. Préparation des bios actifs

2.1.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation (figure 15) durant 8 heures. On introduit 50g des aiguilles sèches dans un ballon qu'on remplit avec 250ml d'eau distillée et le tout est porté à l'ébullition, l'eau et l'huile se séparent lors de la condensation des vapeurs chargés d'huiles, les huiles essentielles ont été récupérés dans des petits flacons opaques et conservé à l'abri de la lumière à la température de 4°C.

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Le rendement exprimé en pourcentage et calculé par la formule :

$$R_{HE} = (M_{HE}/M_{MV}) \times 100$$

Avec : R_{HE} : rendement d'huile essentielle en pourcentage.

M_{HE} : masse de l'huile essentielle en gramme.

M_{MV} : masse de la matière végétale en gramme.



Figure 15 : L'hydro-distillateur (appareil d'extraction des huiles essentielles).

2.1.2. Préparation des extraits aqueux

Afin de préserver la totalité des molécules et des pigments, les aiguilles de pin d'Alep ont été conservées à température ambiante, à l'abri de la chaleur et de la lumière. L'extraction a été faite selon la méthode de macération décrite par (Younssi et Zadeh ,2002).

➤ **Principe :**

Le principe de cette méthode consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide enfin d'en extraire les principes actifs, pour ce faire, le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide/ liquide, ensuite dissoudre le composé actif présente à l'intérieur et l'entraîner

vers l'extérieur, l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté se fait par dialyse ou par diffusion (Younssi et Zadeh, 2002).

➤ **Technique**

25 g des aiguilles de pin d'Alep de chaque altitudes sous forme de poudre ont été macérés dans 250 millilitres d'eau distillée, après une agitation de 72 h, à température ambiante à l'obscurité, une filtration sur papier filtre suivis d'une centrifugation à 5000 RPM pendant 10 minutes à 4°C a été réalisée, le filtrat obtenu a été débarrasser de son solvant par évaporation à 40°C et ce afin d'obtenir un extrait sec. Ce dernier, a été conservée à 4°C et à l'abri de la lumière pour des éventuelles expérimentations (**figure 16**).



Figure 16 : Quelques étapes de la macération des extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep.

2.2.Détermination des propriétés biochimiques

2.2.1. Dosage des composés phénoliques totaux

➤ **Principe**

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode décrite par **Singleton et Rossi (1965)** en utilisant le réactif Folin ciocalteu. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdène ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Son principe est basé sur l'oxydation des composés phénoliques en milieu alcalin par le réactif Folin ciocalteu. Cette réaction entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu présentant un maximum d'absorption à une longueur d'onde $\lambda = 760$ nm et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de composés phénolique présent dans l'échantillon .Le dosage des composés phénoliques a été effectué par la comparaison de la densité optique observé à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

➤ **Technique**

Dans des tubes à essai, 0,5 ml de chaque extrait a été ajouté à 2,5 ml de Folin-Ciocalteu (RFC) (dilué dix fois). Après incubation de 3 minutes, 1 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à (20%) a été ajouté, le mélange ainsi obtenu a été incubé de nouveau pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité (Singleton et Rossi, 1965).

La lecture des absorbances a été faite à longueur d'onde $\lambda = 760$ nm contre un blanc sans extrait. La concentration en composés phénoliques totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage (Singleton et Rossi, 1965)

➤ **Expression des résultats**

La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligramme d'Acide Gallique Equivalent (GAE)/100g d'extrait, selon la formule suivante (Gaouar, 2011):

$$T = [(C \times V \times D) / P] \times 100$$

Dont:

T: Teneur en polyphénols totaux (mg GAE /100g 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).

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

➤ **Principe**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Ceci traduit le fait que le métal perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbant dans le visible à 415 nm (Alyafi, 2007).

➤ **Technique**

1,5 ml de la solution de chaque extrait ont été ajoutés à 1 ml de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2% (dissout dans le méthanol pur). Le mélange a été vigoureusement agité, puis l'ensemble a été incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 10 minutes. L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 430 nm. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée avec un flavonoïde de

référence (la Quercitrine). La teneur en flavonoïde est exprimée en microgramme équivalent de Quercétine / milligramme d'extrait ($\mu\text{g Eq/mg}$ d'extrait).

2.2.3. Dosage des tanins condensés

➤ Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A d'acide gallique pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (Schofield et al, 2001).

➤ Technique

A 250 μl de chaque extrait, sont ajoutés 2,5 ml de la solution de sulfate ferreux (77 mg de sulfate d'ammonium ferrique $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ dissous dans 500 ml de (3 :2 n_butanol : HCl)). Après une incubation à 95 °C dans un bain marie pendant 50 min, l'absorbance est mesuré à 530 nm.

La concentration des tanins condensés (proanthocyanidines) est déduite à partir de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique et sont exprimées en microgramme d'équivalent acide gallique par un milligramme d'extrait ($\mu\text{g E cat/mg}$) (Schofield et al, 2001).

3.3. Evaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne des bioactifs du pin d'Alep

3.3.1. Activité antibactérienne

Les composés phénoliques, les résines et les huiles essentielles sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Dans cette optique, les bioactifs préparés de pin d'Alep ont été mis en contact avec quelques souches bactériennes.

La mise en évidence et l'évaluation de la bioactive des différentes populations a été réalisé par une méthode très répandue dans ce domaine.

Les souches à leur arrivée ont été conservées à 4°C dans des tubes contenant 10ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

3.3.1.1. Préparation des milieux de culture

Suivant les méthodes employées et selon les souches bactériennes, trois milieux de culture ont été préparés :

- Le milieu de cultures cétrimide gélosée (GC) pour le repiquage de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. 43 g de la poudre de (GC) a été mélangée avec 1 L d'eau distillé sous agitateur sur une plaque chauffante jusqu'à l'obtention d'un liquide homogènes. Ce dernier a été stérilisé dans l'autoclave pendant 15 mn à 120°C.
- Le milieu de culture King B pour le repiquage de la bactérie *Erwinia carotovora* 43 g de la poudre de (King B) a été mélangée avec 1 L d'eau distillé sous agitateur sur une plaque chauffante jusqu'à l'obtention d'un liquide homogènes. Ce dernier a été stérilisé dans l'autoclave pendant 15 mn à 120°C.
- Le milieu de culture Mueller-Hinton (MH) pour le test antibactérien: 36 g du MH poudre a été mélangée avec 1 L d'eau distillé sous agitateur sur une plaque chauffante jusqu'à l'obtention d'un liquide homogènes. Ce dernier a été stérilisé dans l'autoclave pendant 15 mn à 120°C.

3.3.1.2. Préparation des pré-cultures

A partir de la gélose nutritive de conservation, un prélèvement des souches a été effectué à l'aide d'une anse de platine, puis mis dans 5 ml de bouillon nutritif et incubé à 28°C pendant 18 heures. Après ce temps d'incubation, les souches ont subi un repiquage par la méthode de stries en milieu solide correspondant à chaque souche : cétrimide pour *Pseudomonas aeruginosa* et King B pour *Erwinia carotovora*. Ces ensemencement ont été suivis d'une incubation de 24h à 28°C et ce afin d'obtenir des cultures jeunes.

3.3.1.3. Effet des bioactifs du pin d'Alep sur les germes phytopathogènes

La méthode a effectuée pour évaluer l'activité antibactérienne des bioactifs du pin d'Alep, a été : la méthode de diffusion sur gélose (disques).

➤ Principe

Cette méthode est très courante dans les laboratoires de microbiologie. Elle est peu couteuse et facile à réaliser. Elle est très informative, elle permet la détermination de la résistance ou la sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis les composés testés et/ou les extraits qui les contiennent.

Le principe de cette technique est le même que celui du test d'antibiogramme, dont les disques sont chargés des extraits, des huiles essentielles ou de solution de résine (résine séchée, broyée et mise en solution dans le DMSO) et déposés à la surface des

milieux de cultures solidesensemencés par des espèces bactériennes bien déterminées (Celiktas et al, 2007)

Les bioactifs commencent à diffuser dès leurs application sur le milieu de culture, et pour favoriser la croissance bactérienne, les boites sont incubées dans l'étuve pendant 24 heures ou plus selon la bactérie.

L'effet des bioactifs sur la croissance bactérienne se traduit par l'apparition d'une zone appelée « zone inhibition » dépourvue des bactéries, claire et facilement mesurable.

◆ **Technique**

Les bioactifs issus des différentes populations de pin d'Alep sont reconstitués à partir d'une culture jeune de 18h d'incubation, une suspension bactérienne a été réalisée dans de l'eau physiologique stérile et ce pour chaque souche la turbidité de cette suspension a été ajustée à 0,5 Mac Farland puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à 10^6 germes/ml. Par la suite, cet inoculum a étéensemencé à l'aide d'un écouvillon par la technique des stries sur tout la surface des boites de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton. Les boites de Pétri ainsiensemencées ont été laissées sécher à l'aire libre pendant 30 minutes.

Quatre boites sont utilisées pour chaque souche. Des disques de papier Whatman N°3 (Ø 5 mm) stérilisés à 120°C pendant 30 min ont été imbibé de 30µl des bioactifs des trois altitudes (extraits aqueux, résine ou huile essentielle) en une concentration de 50µl/ml (pour les extraits aqueux et la résine. l'huile essentielle a été utilisée pure) dans chaque boite. Puis ces disques ont été déposés à la surface de la géloseensemencée (figure 17).

Dès l'application des disques imprégnés, le bioactif diffuse de manière uniforme et après 24 heures d'incubation, l'apparition, autour des disques, d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de microorganismes dénote la sensibilité de ceux-ci à ce bioactif. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible.

L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque la lecture des boites a été faite après 24h d'incubation à une température de 28°C .Parallèlement, des boites dites témoins négatifs avec des disques contenant de DMSO diméthylsulfoxy de (DMSO) dilué 3 /10, ont été préparées. Ce test a été réalisé en duplicate



Figure 17 : Disposition des disques dans les boîtes de pétries

Après incubation, la sensibilité des bactéries cibles envers les différents extraits est classée selon les diamètres des halos d'inhibition déterminés par (Ponce et al,2003) :

- 0 à 8 mm : bactérie non sensible ou résistante.
- 9 à 14 mm : bactérie sensible ou intermédiaire.
- 15 à 19 mm : bactérie très sensible.
- 20 mm ou + : bactérie extrêmement sensible.

L'activité antibactérienne a été déterminée à l'aide d'une règle à coulisse mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (mm) à l'extérieur de la boîte fermée.

3.3.2. Activité antifongique

3.3.2.1. Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture PDA est favorable pour la croissance des champignons phytopathogènes. Pour préparer ce milieu, 300 grammes de pomme de terre bien épluchée et découpée en petits morceaux ont été bouillies dans 1 litre d'eau distillée, à 100°C. Après 25 minutes l'eau de pomme de terre est récupérée (environ 300 millilitres) et ajoutée à 300 millilitres d'eau distillée contenant 20 grammes d'agar-agar et 20 grammes de saccharose, puis ajustée au volume de 1 litre par l'eau distillée. Le milieu est ensuite versé dans des flacons et passé à l'autoclave à une température de 121 °C pendant 15 minutes sous pression de 1 bar.

3.3.2.2. Purification des souches

La purification a été effectuée avec un matériel stérile et sur une paillasse bien désinfectée autour du bec benzène. Avant d'entamer la purification, le milieu de culture PDA a été coulé dans les boîtes de pétri et laissé se solidifier. La purification a été procédée à l'aide d'une série de repiquage. Un prélèvement, au bord de la colonie, d'un fragment du mycélium du champignon phytopathogène a été effectué à l'aide d'une pipette pasteur stérile et a été

déposé au centre de la nouvelle boîte de pétrie. Les boîtes sont recouvertes par un film alimentaire pour éviter la contamination et incubées à 28°C pendant 7 jours.

3.3.2.3. Test antifongique

Des boîtes de pétri stériles préalablement coulées, sont ensemencées en surface (**figure18**): nous avons prélevé un disque (morceau de champignon) et le déposé au centre de la boîte. Ensuite 4 puits sont creusés dans chaque boîte pétrie à l'aide des pipettes pasteur stériles, chaque puit est rempli par 30 µl d'un bioactif (extrait aqueux, résine ou huile essentielle) de chaque population à une concentration de 50 µg/mlml (pour les extraits aqueux et la résine. l'huile essentielle a été utilisée pure). Le diamètre d'inhibition qui traduit l'activité antifongique est déterminé après une incubation de 7 jours à 28°C.

La lecture s'effectue en comparaison avec une boîte de témoin négatif qui contient le DMSO à la place de l'extrait. Cette boîte est ensemencée en même temps que les autres boîtes et dans les mêmes conditions. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule

$$\text{I \%} = \frac{Dc - De}{Dc} * 100$$

Avec : **I %** : Pourcentage d'inhibition.

Dc : Diamètre des colonies dans les boîtes témoins.

De : Diamètre des colonies dans les boîtes qui contiennent l'extrait.



Figure 18 : Quelques étapes du test antifongique

4. Analyse statistique

La partition de la variance, pour les caractères biochimique est estimée entre les extraits et pour l'activité antimicrobienne entre extraits, entre souches microbienne et entre concentrations des extraits, par l'analyse statistique de la variance (ANOVA) en utilisant le Type III (SPSS V. 16) pour le calcul de la sommes des carrés. Les groupes homogènes de provenances concernant chaque trait mesuré sont séparés par le test de *Tukey*.

Chapitre 4:

Résultats et discussion

Chapitre 4 : Résultats et discussions

1. Résultats

1.1. Détermination du rendement d'huiles essentielles

Les résultats, illustrés dans la figure 19, d'évaluation des rendements en huiles essentielles des aiguilles de pins d'Alep, en fonction de l'altitude, révèlent que la zone de Sidi El Ghoul qui se trouve à 1325 m donne les rendements en huiles essentielles les plus élevés (0,08%) par rapport aux deux autres zones Guendouz (1023m), El Khaloua (496m) qui donnent respectivement 0,044% et 0,022%.

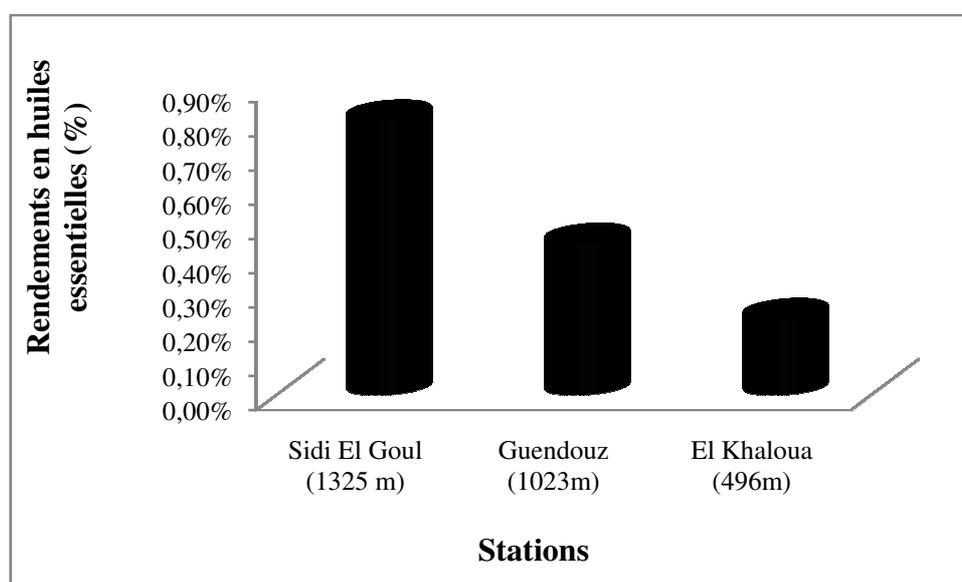


Figure 19 : Variations des rendements en huiles essentielles, des aiguilles de pin d'Alep, en fonction de l'altitude.

On remarque clairement qu'il y a une corrélation nette entre le rendement en huiles essentielles des aiguilles de pin d'Alep et l'altitude. Plus l'altitude augmente, plus les rendements en huiles essentielles augmentent d'avantage.

1.2. Analyse quantitative des composées phénoliques des extraits aqueux

1.2.1. Teneurs en polyphénols totaux

Le tableau d'analyse de la variance (Tableau 2) révèle un effet très hautement significatif $p < 0,001$ entre les extraits aqueux. Cela signifie que la teneur en polyphénols diffère d'un extrait à un autre et qu'il y a une influence sur la quantité des polyphénols produite par les aiguilles du pin d'Alep.

Tableau 2 : Analyse de la variance de la teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep.

Sources de variation	ddl	SCE	CM	F	P.
Extraits aqueux	2	747449,481	373724,74	14,762	0,001***
Résiduelle	12	303809,628	25317,469		
Total	14	1051259,11			

Le test de classification des moyens de *Tukey* sépare deux groupes homogènes. Le groupe **(a)** regroupe la zone d'El Khaloua où les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep ont les teneurs les plus faibles en extraits aqueux. Les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep qui ont les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux sont classés dans le groupe homogène **(b)**. Ces extraits ont des valeurs proches.

La figure 20 représente les teneurs en polyphénols totaux exprimés en (mg/ml Eq AG/ 100 g MS). Les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep de la zone d'El Khaloua fournit la teneur la plus faibles en polyphénols totaux avec $934,821 \pm 118,313$ mg/ml Eq AG/ 100 g MS. Les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep de la zone de Guendouz fournit la teneur la plus élevée en polyphénols totaux avec $1443,39 \pm 224,2$ mg/ml Eq AG/ 100 g MS, Une teneur élevée en polyphénols totaux est aussi enregistrée chez les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep de la zone de Sidi El Ghoul ($1363,04 \pm 48,171$). L'effet de l'altitude sur la teneur en polyphénols est clair, car les teneurs élevées en polyphénols totaux sont enregistrées chez les aiguilles des arbres des altitudes hautes.

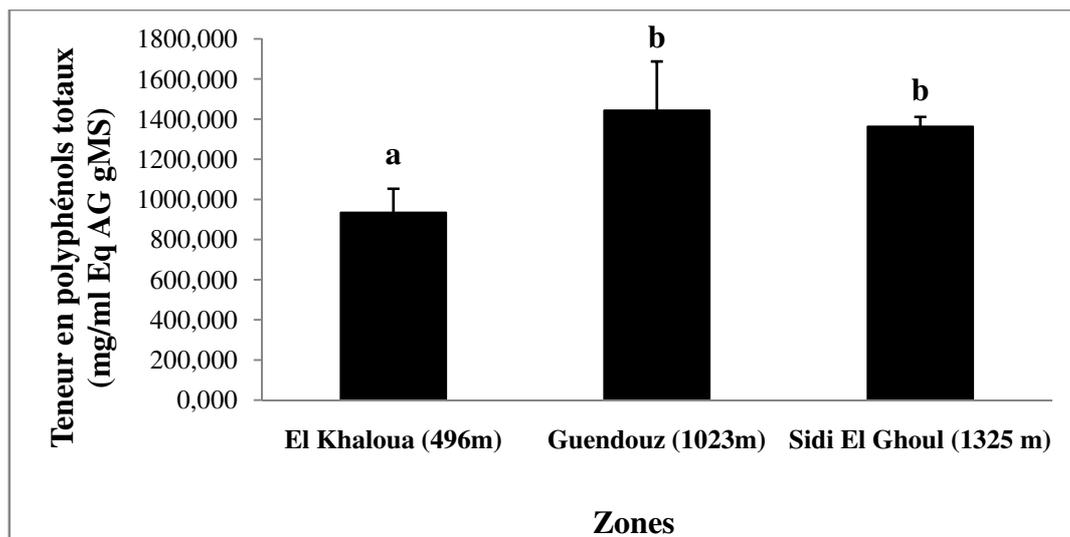


Figure 20 : Variations des teneurs en polyphénols totaux des aiguilles de pin d’Alep, en fonction de l’altitude

1.2.2. Teneurs en flavonoïdes

Le tableau d’analyse de la variance (tableau 3) révèle une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre les extraits aqueux. Cela signifie que les teneurs en flavonoïdes diffèrent d’un extrait à un autre et que l’altitude a un effet significatif sur ce métabolite.

Tableau 3 : Analyse de la variance de la teneur en flavonoïdes des extraits aqueux des aiguilles de pin d’Alep.

Sources de variation	ddl	SCE	CM	F	P.
Altitudes	2	1162,238	581,119	26,926	0***
Résiduelle	12	258,985	21,582		
Total	14	1421,223			

Le test de classification des moyens de Tukey sépare deux groupes homogènes. Le groupe (a) regroupe la zone de Sidi El Ghoul où les extraits aqueux des aiguilles de pin d’Alep ont les teneurs les plus faibles en flavonoïdes. Les extraits aqueux des aiguilles de pin d’Alep qui ont les teneurs les plus élevées en flavonoïdes sont classés dans le groupe homogène (b). Ces extraits ont des valeurs proches.

La figure 21 représente les teneurs en flavonoïdes exprimés en (mg/ml Eq QgMS).

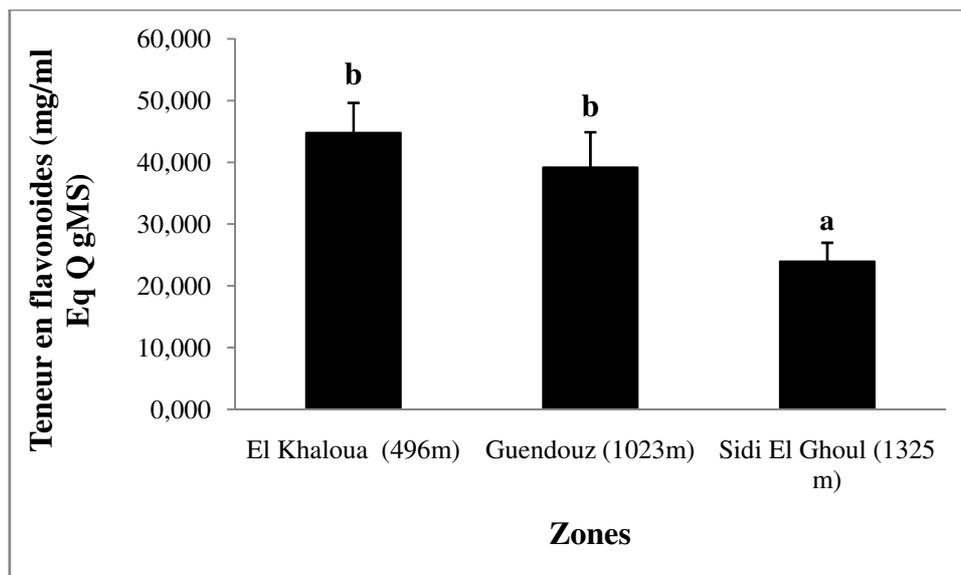


Figure 21 : Variations des teneurs en flavonoïdes des aiguilles de pin d’Alep, en fonction de l’altitude

Les extraits aqueux des aiguilles de pin d’Alep de la zone d’El Khaloua fournissent la teneur la plus élevée en flavonoïdes avec 44,808±4,829 mg/ml Eq Q 100g MS. Les extraits aqueux des aiguilles de pin d’Alep de la zone de Guendouz fournissent aussi une teneur élevée en flavonoïdes avec 39,194± 5,693 mg/ml Eq Q 100g MS. Une teneur faible en flavonoïdes est enregistrée chez les extraits aqueux des aiguilles de pin d’Alep de la zone de Sidi El Ghoul avec 23,973±3,003 mg/ml Eq Q 100g MS. L’effet de l’altitude sur la teneur en flavonoïdes est clair, car les aiguilles de pin d’Alep des altitudes hautes ont des teneurs faibles en flavonoïdes.

1.2.3. Teneurs en tanins condensés

Le tableau d’analyse de la variance (tableau 4) révèle une différence significative ($p < 0,05$) entre les extraits aqueux. Cela signifie que les teneurs en tanin condensés diffèrent d’un extrait à un autre et que l’altitude a un effet significatif sur ce métabolite.

Tableau 4 : Analyse de la variance de la teneur en tanin condensé des extraits aqueux des aiguilles de pin d’Alep.

Sources de variation	ddl	SCE	CM	F	P.
Altitudes	2	209615,719	104807,86	3,796	0,043*
Résiduelle	12	331346,57	27612,214		
Total	14	540962,289			

Le test de classification des moyens de *Tukey* sépare deux groupes homogènes et un groupe intermédiaire. Le groupe homogène (b) regroupe la zone d'El Khaloua où les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep ont une teneur élevée en tanins condensés. Les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep de la zone de Guendouz, qui ont une teneur moyenne en tanins condensés, sont classés dans le groupe intermédiaire (ab). Et les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep de la zone de Sidi El Ghoul, qui ont la teneur la plus faible en tanins condensés, sont classés dans le groupe homogène (a).

La figure 22 représente les teneurs en tanin condensé exprimés en (mg/ml Eq AG 100 g MS). Les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep de la zone d'El Khaloua fournit la teneur la plus élevée en tanins condensés avec $375,625 \pm 70,177$ mg/ml Eq AG 100 g MS. La teneur la plus faible en tanins condensés est enregistrée chez les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep de la zone de Sidi El Ghoul ($88,839 \pm 14,422$). L'effet de l'altitude sur la teneur en tanins condensés est clair, car les extraits aqueux des aiguilles des arbres de pin d'Alep des altitudes hautes ont teneurs faibles par rapport à ceux des altitudes basses.

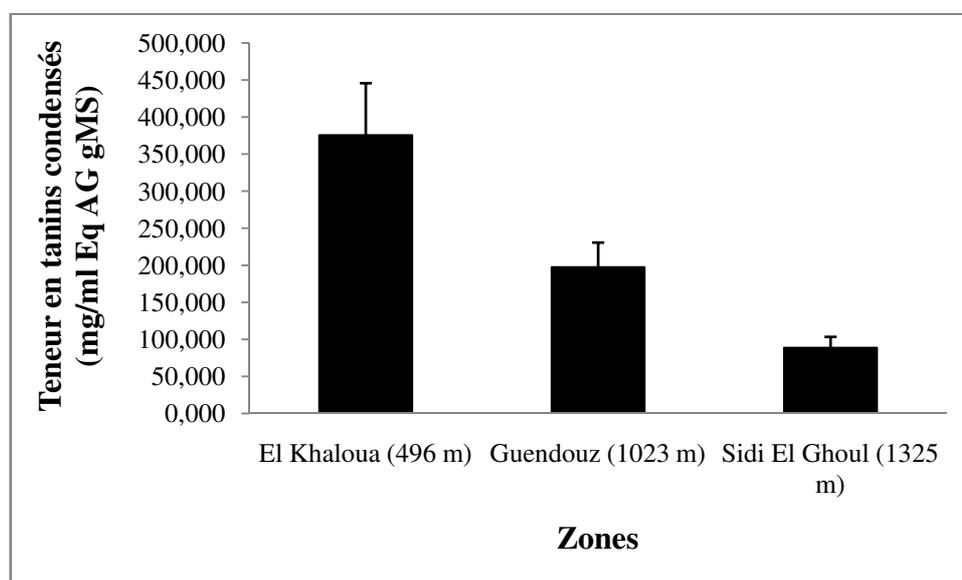


Figure 22 : Variations des teneurs en tanin condensé des aiguilles de pin d'Alep, en fonction de l'altitude

1.3. Activité antimicrobienne

1.3.1. Activité antibactérienne

Le tableau 5 d'analyse de la variance indique qu'il n'y a pas d'effets entre les altitudes ($P>0,05$), ni entre les bactéries ($P>0,05$) ni entre les substances ($P>0,05$). Il y a une différence hautement significative ($p<0,01$) de l'interaction bactéries x substances. Cela signifie que la réponse des bactéries aux différentes substances bioactives (huile essentielle, extrait aqueux et résine) est différente.

Tableau 5 : Analyse de la variance de l'activité antibactérienne des substances bioactives du pin d'Alep.

Sources de variation	Ddl	SCE	CM	F	P.
Altitudes	2	7,137	3,568	0,508	0,605 ns
Bactéries	1	3,602	3,602	0,513	0,477 ns
Substances	2	12,961	6,48	0,923	0,404 ns
Bactéries*Substances	2	79,537	39,768	5,666	0,006**
Résiduelle	46	322,881	7,019		
Total	53	426,118			

La figure 23 représente les variations des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne en mm par les différentes substances bioactives en fonction de l'altitude. A basses altitudes (El Khaloua 496 m), les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep semblent les plus efficace vis-à-vis de la bactérie *Erwinia carotovora* suivis par la solution de résine. Cette efficacité est justifiée par les diamètres élevés des zones d'inhibition de la croissance bactérienne. Alors que, les huiles essentielles sont efficaces vis-à-vis de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

En moyenne altitude (Guendouz 1023 m), la bactérie *Erwinia carotovora* est plus sensible à la solution de résine (13 mm) et la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est très sensible à l'huile essentielle des aiguilles de pin d'Alep (18 mm). Ces Diamètres forts de l'inhibition de la croissance bactérienne explique la sensibilité des bactéries étudiées à ces substances et par conséquent, l'efficacité des ces dernières vis-à-vis des bactéries.

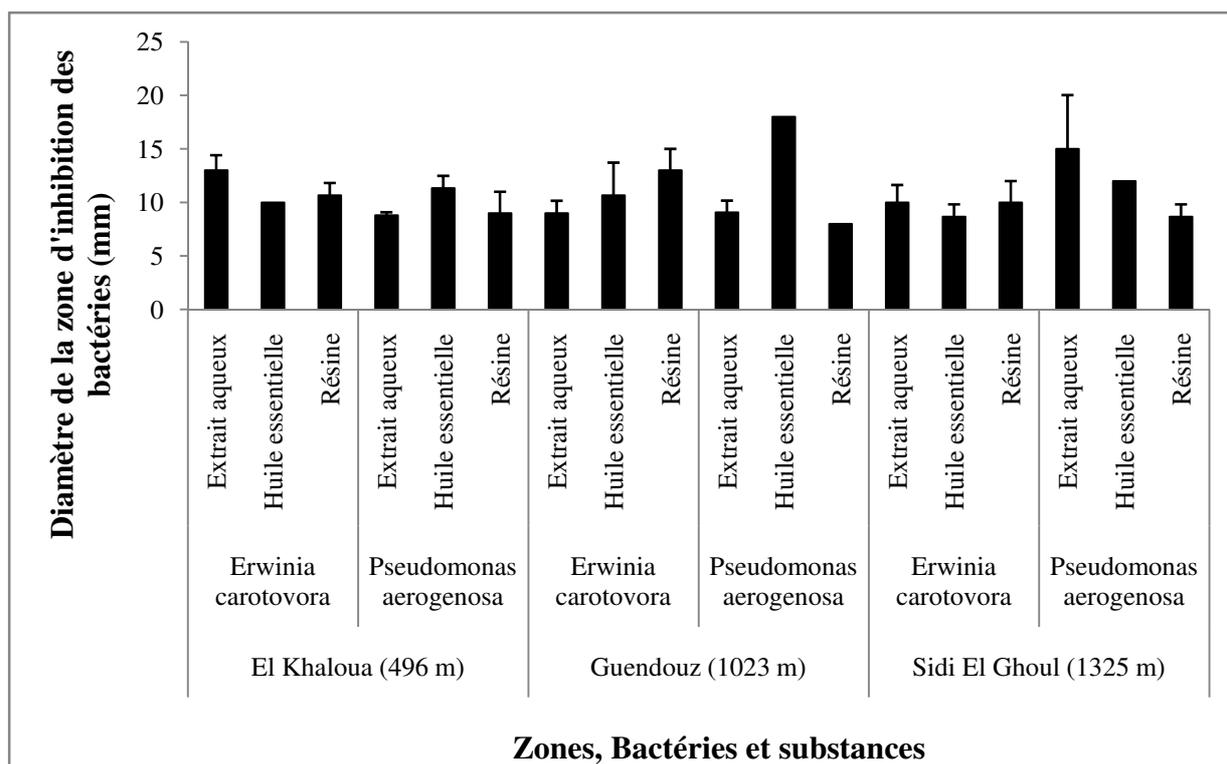


Figure 23 : Variations des diamètres des zones d’inhibition de la croissance bactérienne par les différentes substances bioactives en fonction de l’altitude.

En haute l’altitude (Sidi El Ghoul 1325m), ce sont les extraits aqueux des aiguilles du pin d’Alep qui sont les plus efficaces sur *Erwinia carotovora* (10 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (15 mm). La solution résineuse a donné un effet similaire à celui des extraits aqueux (10 mm) sur la bactérie *Erwinia carotovora* (10 mm) et l’huile essentielle avait un effet considérable sur *Pseudomonas aeruginosa* (12 mm).

Ces mêmes résultats indiquent que la résine, l’huile essentielle et les extraits aqueux des aiguilles de pin d’Alep ont un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne, mais le pouvoir antibactérien diffère selon l’altitude et la souche bactérienne. Il semble *Pseudomonas aeruginosa* est sensible aux huiles essentielles des trois altitudes et à l’extrait aqueux de l’altitude la plus haute. Cela peut être expliqué par la richesse d ces substances en polyphénols qui possèdent une activité antibactérienne. Alors qu’*Erwinia carotovora* est plus sensible à la résine dans les trois altitudes et à l’extrait aqueux de l’altitude forte. Notons que les aiguilles

de la zone de Sidi El Ghoul (1325m) possèdent les teneurs les plus élevées en polyphénols, ce qui rend nos résultats logiques.

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne montre que *Pseudomonas aeruginosa* est plus sensible qu'*Erwinia carotovora* et ce, parce que le maximum de diamètre d'inhibition est enregistré chez *Pseudomonas aeruginosa* (18 mm) alors que le maximum de diamètre d'inhibition est enregistré chez *Erwinia carotovora* est 13 mm.

1.3.2. L'activité antifongique

Le tableau 6 d'analyse de la variance indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les altitudes ($p > 0,05$) et entre les substances ($p > 0,05$). Des effets significatifs ($p > 0,05$) et hautement significatifs ($P < 0,01$) sont respectivement enregistrés pour les champignons phytopathogènes et l'interaction substances x champignons. Ce qui indique que les champignons sont différents et se comportent de façon différente à la présence des substances bioactives, et que l'efficacité de ces dernières vis-à-vis des souches fongique diffère d'un champignon à un autre.

Tableau 6 : Analyse de la variance de l'activité antifongique des substances bioactives du pin d'Alep.

Sources de variation	ddl	SCE	CM	F	P.
Altitudes	2	213,718	106,859	0,651	0,53
Champignons	1	990,398	990,398	6,032	0,021*
Substances	2	511,923	255,962	1,559	0,23
Champignons*Substances	2	1844,826	922,413	5,618	0,01*
Résiduelle	25	4104,654	164,186		
Total	32	7665,519			

La figure 24 illustre les variations des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique par les différentes substances bioactives en fonction de l'altitude.

En faible altitude (El Khaloua 496 m), le champignon *Fusarium* de tomate est plus sensible que le *Fusarium* de blé et ce, à cause de l'efficacité des différentes substances bioactives sur le *Fusarium* de tomate et qui ont le pourcentage d'inhibition les plus élevés.

La résine (28,834%), les huiles essentielles (29,212%) et les extraits aqueux (26,853%) semblent avoir des effets comparables vis-à-vis du *Fusarium* de tomate malgré la

légère supériorité de l'effet des huiles essentielles. C'est dernière enregistrent l'efficacité la plus importante avec le pourcentage d'inhibition de la croissance de Fusarium de tomate la plus élevé (64,639%).

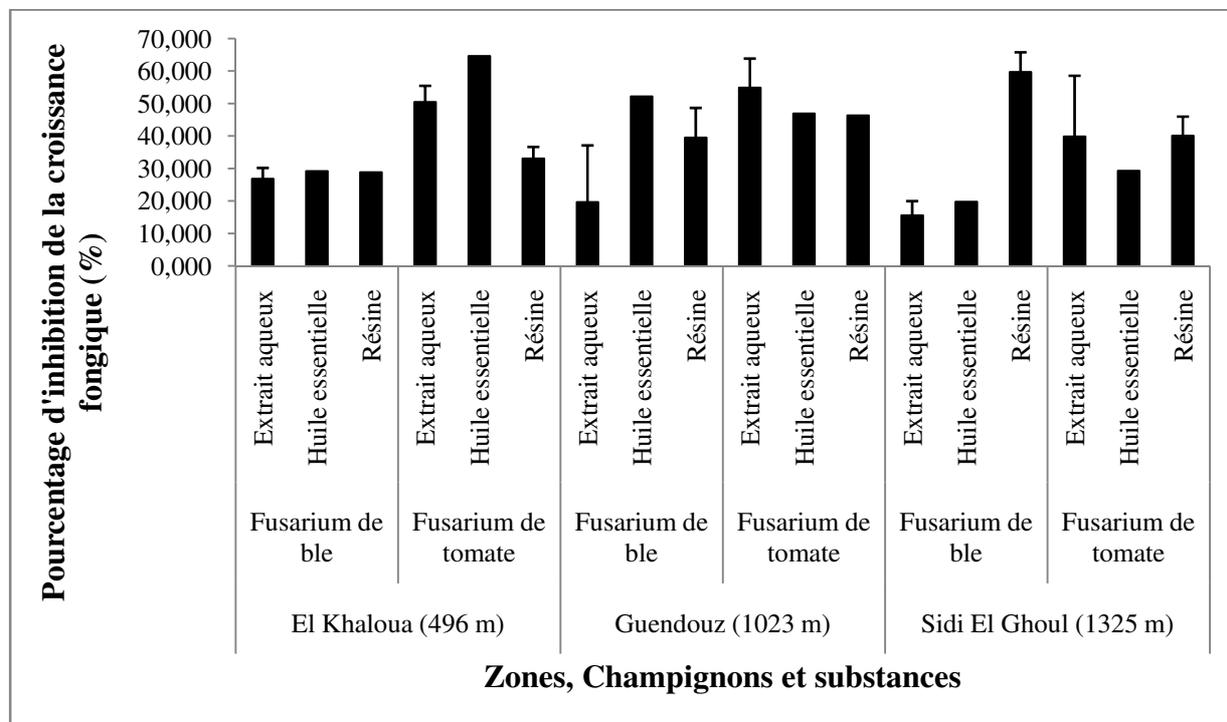


Figure 25 : Variations des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique par les différentes substances bioactives en fonction de l'altitude.

En altitude moyenne (Guendouz 1023 m), le Fusarium de blé semble résistant à l'effet de l'extrait aqueux (19,679%), moyennement sensible à l'effet de la résine (39,523%) mais sensible à l'effet de l'huile essentielle (52,194%). Le Fusarium de tomate est sensible aux trois substances bioactives avec une supériorité de l'efficacité de l'extrait aqueux des aiguilles du pin d'Alep où 54,903% d'inhibition de la croissance fongique est noté. Les huiles essentielles et la résine avaient des effets très proches vis-à-vis de ce champignon (46,959% et 46,358% respectivement).

En forte altitude (Sidi El Ghoul 1325m), la résine semble plus efficace contre les deux champignons testés. Le Fusarium de blé est plus sensible à cette substance parce qu'il est caractérisée par le pourcentage d'inhibition le plus fort.

L'étude biologique montre que le pouvoir antifongique diffère d'une substance à l'autre selon les altitudes. On constate que les substances possèdent un effet antifongique plus efficace sur le Fusarium de tomate que sur le Fusarium de blé.

2. Discussion

A travers cette étude, une évaluation de l'efficacité des substances bioactives sur des bactéries et des champignons, en fonction de l'altitude a été réalisée. L'analyse phytochimique des substances bioactives montre des variations significatives en fonction de l'altitude.

D'après nos résultats, le rendement d'huile essentielle augmente avec l'augmentation de l'altitude. Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par (**Seladji ,2014**) sur les racines de trois pins (*Pinus Halepensis* 0,014%, *Pinus pinea* 0,011%, *Pinus pinaster* 0,05%) et sont en accord avec ceux de (**Sadou et al,2015**) qui ont enregistré des rendements moyens de l'huile essentielle des aiguilles de *P. Halepensis* (Mill.) variant entre 0,3% à la forêt Zaarouria à Souk Ahras et 0,81% à la forêt du lac Mellah dans le parc national d'El Kala . Le rendement de l'huile essentielle de la même espèce récoltée dans la région de Sidi Fredj est de 0,52%. Cette variation est probablement due à la sensibilité de l'huile essentielle aux facteurs biotique et abiotique (**Sadou et al. 2015**).

Risi et Brûlé (1945) signalent que la variation du rendement est en fonction de (i) temps de conservation, un intervalle de temps entre la récolte et la distillation suffisant pour dessécher les feuilles, compromet sérieusement le rendement, (ii) l'habitat de l'arbre, les rameaux d'un arbre isolé et ensoleillé (1.01%) sont plus riches en huiles essentielles que ceux des arbres poussés en plein peuplement forestier (0.51%), (iii) l'âge de l'arbre, les jeunes arbres (1.01%) donnent en général un meilleur rendement que les vieux (0.80%). Cette constatation est conforme à l'opinion générale, quoique, dans certains cas, d'excellents rendements ont été obtenus à partir de vieux rameaux. Par ailleurs, le rendement en huiles essentielles est sous l'influence de facteurs divers, entre autres, l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, l'altitude, le climat, la région de culture et la composition génétique des individus (**Bouyahyaoui, 2017**).

Ces résultats montrent que les extraits aqueux des aiguilles de pin d'Alep constituent une source importante en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés et que l'altitude a un effet significatif sur les teneurs en ces trois métabolites. , les teneurs élevées en polyphénols totaux sont enregistrées chez les aiguilles des arbres des altitudes hautes, ces altitudes ont des teneurs faibles en tanins condensés et en flavonoïdes. par contre se qui enregistré chez les deux autre altitudes (Guy AUBERT, 2007).

En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques (conditions climatiques, des pratiques culturales, de la maturité à la récolte et des conditions de stockage (**Labioud, 2016**).

Selon que l'on se trouve à basse, moyenne ou haute altitude, les conditions thermiques sont bien différentes, Le facteur «température» dépend surtout de l'altitude et de l'exposition,

Le screening des propriétés antimicrobiennes des substances étudiées (les huiles essentielles, les extraits aqueux, et la résine) révèle que ces bioactifs possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis de l'ensemble des souches testées, avec des variations de sensibilité entre les bactéries et les champignons. On a aussi remarqué que les champignons étaient plus vulnérables à ces substances que les bactéries.

Pseudomonas aeruginosa est plus sensible qu'*Erwinia carotovora*, elle est sensible aux huiles essentielles des trois altitudes et à l'extrait aqueux de l'altitude la plus haute. Alors qu'*Erwinia carotovora* est plus sensible à la résine dans les trois altitudes et à l'extrait aqueux de l'altitude forte.

la résine est plus efficace contre les deux champignons testés forte altitude (Sidi El Ghoul 1325m), Le *Fusarium* de blé est plus sensible à cette substance parce qu'il est caractérisée par le pourcentage d'inhibition le plus fort.

L'étude du pouvoir inhibiteur des huiles essentielles des plantes révèle qu'ils exercent un effet inhibiteur sur les souches testées. Il est à noter que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est due, principalement, à sa composition chimique, et en particulier, à la nature de ses composés majoritaires, Elle peut être attribuée, aussi, à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans les huiles essentielles (**Seladji, 2014**).

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux des aiguilles de pin suggèrent que les aiguilles de conifères contiennent des substances antimicrobiennes efficaces. Par conséquent, elles possèdent un potentiel antiseptique naturel efficace, comme elle peut être utilisée dans la conservation des Aliments (**Benseghier et Khamed, 2014**).

La capacité des espèces végétales à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec leur teneur en tanins. Ces tanins ont été largement utilisés par les civilisations égyptienne, romaine, et grecque pour leurs propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses (**Rhazi, 2015**).

Les flavonoïdes représentent le plus grand groupe de composés phénoliques présents chez les végétaux, Une des fonctions incontestée des flavonoïdes est leur rôle dans la protection des plantes contre des attaques microbiennes et des herbivores. Ils peuvent aussi s'accumuler comme phytoalexines en réponse aux attaques microbiennes (**Touahri, 2014**).

Conclusion

Conclusion

Les progrès remarquables accomplis ces dernières années en termes de compréhension des mécanismes qui sous-tendent la résistance induite chez les plantes ont pavé la voie au développement d'agents et de produits susceptibles de mimer l'effet des éliciteurs naturels de réactions de défense.

Au cours de ce travail, il a été montré l'importance de quelques métabolismes secondaires issus du pin d'Alep par le biais de l'étude de ces compositions chimiques et de l'activité antibactérienne et antifongique.

L'effet de l'altitude est net sur le rendement en huiles essentielles des aiguilles de pin d'Alep. Plus l'altitude augmente, plus les rendements en huiles essentielles augmentent d'avantage.

L'étude biologique montre que le pouvoir antimicrobien diffère d'une substance à l'autre, en rapport direct avec les différences de leurs compositions chimiques respectives et leur situation géographique.

Pseudomonas aeruginosa est plus sensible qu'*Erwinia carotovora*, elle est sensible aux huiles essentielles des trois altitudes et à l'extrait aqueux de l'altitude la plus haute. Alors qu'*Erwinia carotovora* est plus sensible à la résine dans les trois altitudes et à l'extrait aqueux de l'altitude forte.

La résine est plus efficace contre les deux champignons testés a forte altitude (Sidi El Ghoul 1325m), Le Fusarium de blé est plus sensible à cette substance parce qu'il est caractérisée par le pourcentage d'inhibition le plus fort.

Au terme de l'analyse phytochimique de l'extrait aqueux, plusieurs groupes de composés chimiques tels que les flavonoïdes, les tanins et polyphénols, ont été détectés, les teneurs élevées en poly phénols totaux sont enregistrées chez les aiguilles des arbres des altitudes hautes, ces altitudes ont des teneurs faibles en tanins condensés et en flavonoïdes.

Les résultats de ce travail indiquent la capacité de ces substances dans la lutte biologique et que ces substances peuvent avoir une utilisation commerciale en tant qu'agent de prévention contre les microbes.

L'effet inhibiteur de ces métabolites sur le développement des microorganismes laisse entrevoir des perspectives d'application dans les domaines de l'industrie alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et celle de la lutte contre les ennemis de la culture.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Alaoui Assmaa, Laaribya S, 2011, Production, croissance et modèles de conduite sylvicoles des principales essences (le pin maritime et le pin d'Alep) de reboisement au Maroc Kastamonu Univ., Journal of Forestry Faculty , N° 11 (16) morroco, 68 – 84p
- Amari M, Mechouche K, 2017, Contribution à l'étude des activités biologiques de la résine de Pinus Halpensis Mill, mémoire de master, Université A. MIRA – Bejaia 40p.
- Ariane B , Bénédicte H, Biowallonie, 2017, méthodes de protection des Plantes en agriculture biologique itinéraire bio : le magazine de tous les acteurs du bio, Ed. resp. Philippe Grogna 59p.
- Bachir k, 1987. Contribution à l'étude du pin d'Alep (Pinus halpensis Mill.) en Algérie : écologie dendrométrie morphologie. Office des publications universitaires. 02 p.
- Becker M., picard J.F., Timbel., avec la collaboration de Germain G et Navarin J., 1981. La forêt : maison et réalisation éditoriales pédagogiques, paris. 182 p.
- Benhamou N, Picard K. 1999. La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. Phytoprotection,. Éditeur(s) Société de protection des plantes du Québec (SPPQ). 168 P.
- Benseghier k, khamed o, 2014, huiles alimentaire de graines pinus pinea extraction et caractérisation physique-chimique, mémoire de master, universite kasdi merbah – ouargla – 127 p.
- Boher B, 1987, les bactéries parasites des plantes cultivées en république populaire du congo, laboratoire de phytopathologie centre orstom b, brazzaville, 7p
- Bouyahyaoui A., 2017. Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l'Atlas algérien. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem. 115p.)
- Alabouvette c, 2007, microorganismes utiles en agriculture : microorganismes agents de lutte biologique. Copyright – academie d'agriculture de france. 2 p
- Camps C, Vincent M, Chloé M , Matthias P , 2012, Souche de Lactobacillus utilisée comme agent de lutte biologique contre Pythium ultimum sur tomate, Université des sciences

- appliquées de Zurich, Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture | Vol. 44 (6), 344–348p.
- Chakroun M.L, 1986, Le pin d'Alep et le pin brutia dans la sylviculture méditerranéenne, Options Méditerranéennes : Série Etudes; n. 1986-I pages 25- 27
- Commission Des Communautés Européennes, direction générale de l'agriculture Direction Economie Agricole- Division Bilans, Etudes Informations Statistiques, 1975, Méthodes de lutte intégrée Et de lutte biologique en agriculture : Conditions et possibilités de développement. 143 p.
- Dahmane M, 1986, Les produits du pin d'Alep en Tunisie, Options Méditerranéennes : Série Etudes; n° 1986-I, 157- 161 P.
- Debazac E.F., Tomassone R., 1965. Contribution à une étude comparée des Pins méditerranéens de la section Halpensis, Annales des sciences forestières, INRA/EDP Sciences, <10.1051/forest 213-256 P.
- Declert C., 1970, la fusariose de la tomate influence du chlorure de sodium sur la sensibilité des plantules a l'infection par le Fusarium oxysporum f, lycopersici (sacc.), snyd. et hans.10p
- Djaalab M, 2014. Hadria évaluation chimique et activité antidermatophyte de quelques plantes médicinales d'Algérie université de Constantine l'institut des sciences vétérinaires. 161 p.
- Vachon e, Anne V, Sylvie R, Yves D, Annie G et Jofroi D, 2011, Lutte Biologique À La Fusariose De L'épi Du Blé Par Culture Intercalaire Et Usage D'agent Biologique De Contrôle revu 09-INNO1-23. 3P.
- Entretien avec Monsieur Hocine BESSAIH, Wali de Tissemsilt, 2014, Agence Nationale de Développement de l'Investissement, 6p
- Feknous S, Fairouz S, Ramdhane M .S, Extraction, 2014, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.) Revue « Nature & Technologie ». A- Sciences fondamentales et Engineering, n° 11, 2014.Algérie. 07 à 13 P.
- Lefort f, 2010, Lutte biologique et lutte microbiologique des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes, Groupe Plantes et Pathogènes, Institut Terre Nature Paysage et Filière Agronomie, Hepia HES-SO//Genève, 57p

- Simard f, 2007, évaluation du potentiel anticancéreux des extractibles du bois de pin rouge, l'université du Québec à Chicoutimi, p83
- Chouinard g, Gagnon s, 2001, méthodes alternatives à la lutte chimique en domiculture, principale techniques applicable au Québec, nature action, 49 P.
- Guy A, 2007. Rôle des facteurs du milieu dans la différenciation de la couverture végétale, 68p
- Halabi M.K., 2014. Etude de la diversité de *Pectobacterium* spp et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes. 219 p.
- Nahal I, 1962, le pin d'Alep (*Pinus Halpensis* Mill.): Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole, annales de l'école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences Nancy : école nationale des eaux et forêts 686p.
- J.Lhoste, M.L. Normand 1987 la lutte contre les insectes nuisibles à l'agriculture et son influence sur l'environnement, association internationale des entretiens écologique. Paris, 41 p.
- Ponchet j, 1982, Réalités et perspectives de la lutte biologique contre les maladies des plantes. Agronomie, EDP Sciences, 2 (4), pp.305-314.
- Macheix j, Annie F, Christian Jay-Allemand., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. Italie. 192 p.
- Bigre J, Morand J, Tharaud M, 1987. Pathologie des cultures florales et ornementales. 167 p.
- Perron K, Schrenzel J, Linder P, 2010, les bactéries et les hommes de la santé au développement durable, université de Genève, 39p
- Labioud R, 2016, Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydant et activité fongicide, thèse de doctorat, université Badji Mokhtar-Annaba faculté ,162p.
- Didierlaurent L, 2017, trois glycosyltransférases du métabolisme secondaire d'*Arabidopsis thaliana* impliquées dans les réponses de défense aux microorganismes pathogènes Sciences agricoles. Université Paris Sud – Paris n° XI, 2012. ,422p

- Medjdoub O, et Oubernine H, 2017, Activité antioxydant et Anti-inflammatoire de pin, Université A. MIRA – Bejaia.
- Mesaros N., P. Nordmann, P. Plésiat, M. Roussel-Delvallez, J. Van Eldere, Y. Glupczynski, Y. Van Laethem, F. Jacobs, P. Lebecque, A. Malfroot, P.M. Tulkens¹, F. Van Bambeke 2007. *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. 126 p
- M. Lacroix, L. Vézina, S. Desjardins et C. Beaulieu, 1995. Comparaison de techniques d'identification des *Erwinia* et des *Pseudomonas* responsables de la pourriture molle, Volume 76, numéro 1, Éditeur(s) Société de protection des plantes du Québec (SPPQ), 27–37 p.
- Rhazi N, 2015, Mise au point de mélanges collants écologiques d'Acacia mollissima du Maroc, thèse de doctorat, L'Université Hassan II de Casablanca L'Université de Pau et des Pays d'Adour, 153p
- Touahri N, 2014, Extractibles nodaux des essences forestières tempérées, Mémoire de stage université de lorraine 34p
- Mansouri N, Badr S, Ghanmi M, Lahsen El Ghadraoui, Aafi A ,2010. Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata* du Maroc, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011 15(3), 415-424 P.
- Ris N, 2016, La lutte Biologique contre les ravageurs de cultures : Généralités, Exemples, Intérêts et Limites. Conférence AMIC Nice – Côte d'Azur p52.
- Benhamou N et Rey P, 2012, Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une Nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. : I. Principes de la résistance induite (Société de protection des plantes du Québec (SPPQ) ,23p
- Rakotoarimanga N, Jefferson Z, Ramamonjisoa D Et Ramanankierana H, 1739, Lutte biologique antifongique : actinomycètes du sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate pourri, Afrique, ISSN 1813-548X, 243 - 255 p
- Lepoivre p, 2003. *Phytopathologie*. Éditions de Boeck université, éditeur DE BOECK SUPERIEUR, Belgique. 427 P
- QUEZEL P et Barbero M, 1992 le pin d'Alep et les espèces Voisines : répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France XIII, n° 3, 170p.

- Ponchet J., 1982. Réalités et perspectives de la lutte biologique contre les Maladies des plantes, n° 2 (4), EDP Sciences, 305-314 P.
- Risi J., Brûlé M., 1945. Étude des huiles essentielles tirées des feuilles de quelques conifères du Québec. Bulletin n°9 : Ministère des terres et forêts, Service Forestier. Québec, Canada. 52 p.
- Duponnois D, Amadou M Bâ, 1997, Champignons contre nématodes : lutte biologique au Sénégal, fonds documentaire ORSTUM, cote : B*12538 EX : 1 , 39p.
- Ryckewaert P, M. Leblay, 2004, Principes généraux de la lutte intégrée sur cultures maraîchères en Polynésie française : Reconnaissance des ravageurs et des auxiliaires, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement Ministère de l'agriculture et de l'élevage Service du Développement Rural Département Agriculture 16p.
- Victoria S, 2011, faut t il réhabiliter le pin d'Alep ? , SYNDICAT DES PROPRIÉTAIRES FORESTIERS SYLVICULTEURS DES BOUCHES-DU-RHÔNE, foret privée française, 6 p.
- Sadou N., Seridi R., Djahoudi A., Hadeff Y. 2015. Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de Pinus halepensis Mill. Du Nord est Algérien. Rev. Sci. Technol., Synthèse30, Algérie. 33-39 P.
- Seladji D, 2014, compositions chimiques, propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des racines de trois Pinaceae d'Algérie, mémoire de master, université abou bekr belkaïd de Tlemcen ,40p
- Sellami S., S. Tounsi, K. Jamoussi, 2015, La lutte biologique, alternative aux produits phytosanitaires chimiques Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire des Bio pesticides, B .P. "1177" 3018. / Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, 19(5), 736-743p
- SemaL j, 1996. Traité de pathologie végétale. Date de parution : 07-1989, 621 p.
- Sghaier T., J.J. Clautriaux, 2014, Interaction provenances-environnements du Pin d'Alep (Pinus Halpensis Mill.) en Tunisie, Communication présentée à la Classe des Sciences techniques, Institut National de Recherches en Génie Rural, Eaux et Forêts, BP 10, 2080 Ariana (Tunisie) . 18p.

Sghaier T, Ammari Y, 2012, Croissance et production du pin d'Alep (*Pinus Halpensis* Mill.) en Tunisie Institut national de recherches en génie rural, eaux et forêts, BP n10, 2080 Ariana, Tunisie ,20p

Tanguy J, 2015, Classification, évolution et reproduction des 'végétaux, Service de Psychophysiologie, Faculté des Sciences et des Techniques Université de Nantes. 71 P

Vennetier M., C. Ripert, F. Brochiéro, C. Rathgeber, O. Chandieux, R. Esteve, 2011, Évaluation de la croissance du pin d'Alep en région méditerranéenne française. *Article publié dans la Revue Forestière Française, n°5-2010*, France, 11 p.

Derbal W , Zerizer A, Gérard J, Guibal D, 2015 , Caractérisation d'aboutages à entures multiples pour trois essences d'Algérie, Bois et forêts des tropiques, n° 325 (3) Bois aboutés en Algérie, 59 p.

احمد شمس الدين، 2006، التداوي بالاعشاب و النباتات الطبية قديما و حديثا، دار الكتب العلمية بيروت لبنان. 424 ص

Résumé

Dans le cadre de la recherche sur les procédés de lutte biologique basée sur l'utilisation des molécules naturelles des plantes contre certaines maladies, nous nous sommes intéressée à l'évaluation des propriétés antimicrobiennes de quelques métabolites secondaires de pin d'Alep (la résine, les extraits aqueux les huiles essentielles) dans trois régions à des altitudes différentes, sur 4 souches microbiennes associées à plusieurs pathologies du plante a été réalisée.

L'évaluation des propriétés antimicrobiennes a été faite par la méthode de diffusion des disques sur gélose pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition des bactéries, et par la méthode de diffusion des puits pour la détermination des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique.

L'analyse phytochimique des extraits aqueux a montré la présence des groupes de composés biologiquement actifs, parmi lesquels les flavonoïdes, les tanins condensés et les polyphénols. Il a été constaté que ces bioactifs possèdent une très forte activité réductrice sur les souches microbiennes et diffère selon les altitudes. Les teneurs élevées en poly phénols totaux sont enregistrés chez les aiguilles des arbres des altitudes hautes, ces altitudes ont des teneurs faibles en tanins condensés et en flavonoïdes. Les substances possèdent un effet antifongique plus efficace sur le *Fusarium* de tomate que sur le *Fusarium* de blé. La comparaison des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne montre que *Pseudomonas aeruginosa* est plus sensible qu'*Erwinia carotovora*.

Mots clés : pin d'Alep, altitudes, extraits aqueux la, résine, huiles essentielles

Abstract

As part of the research on biological control methods based on the use of natural plant molecules against certain diseases, we are interested in evaluating the antimicrobial properties of some secondary metabolites of Aleppo pine (the resin, the aqueous extracts the essential oils) in three regions at different altitudes, on 4 microbial strains associated with several pathologies of the plant was carried out

The evaluation of antimicrobial properties was made by the agar disk diffusion method for determining the diameters of the bacterial inhibition zones, and by the well diffusion method for the determination of inhibition percentages. fungal growth.

Phytochemical analysis of aqueous extracts showed the presence of groups of biologically active compounds, including flavonoids, condensed tannins and polyphenols. It has been found that these bioactives possess a very strong reducing activity on the microbial strains and differ according to the altitudes. The high levels of total poly phenols are recorded in the needles of high altitude trees, these altitudes have low contents of condensed tannins and flavonoids. The substances have a more effective antifungal effect on tomato *Fusarium* than on wheat *Fusarium*. Comparison of the diameters of the zones of inhibition of the bacterial growth shows that *Pseudomonas aeruginosa* is more sensitive than *Erwinia carotovora*

Key word: Aleppo pine, altitudes, aqueous extracts , resin , essential oils

